

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich Heine Universität
Prof. Dr. med. HE. Gabbert

Mechanismen der Apoptoseresistenz in
malignen Tumoren:
Molekularpathologische Untersuchungen am
Modell humaner Nierenzellkarzinome

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

BEATE CZARNOTTA
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: Priv.-Doz. Dr. Ramp

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Schott

Gewidmet
in Gedenken an
meine liebe Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Das Nierenzellkarzinom.....	10
1.2	Die Apoptose	13
1.3	Das CD95-System.....	17
1.4	Der lymphozyten-assoziierte Todesrezeptor (LARD)	20
1.5	Osteoprotegerin und seine Liganden.....	24
1.6	Signaltransduktion über Caspasen.....	26
1.6.1	Caspase-8.....	27
1.6.2	Caspase-9 und ihre Spleißform Caspase-9s.....	29
1.7	Regulation der Apoptose durch das Flice-inhibierende Protein FLIP	32
2	MATERIAL UND METHODEN	36
2.1	Zellkulturmedien	36
2.2	Zelllinien	36
2.3	Chemikalien.....	38
2.4	Lösungen und Puffer	39
2.5	Antikörper	41
2.6	Kits	41
2.7	Geräte.....	41
2.8	Kultivierung der Nierenzellkarzinome	42
2.8.1	Herstellung von Zellkulturüberständen	42
2.9	Isolierung von Gesamt-RNA	42
2.9.1	Gesamt-RNA Isolierung mittels RNeasy Kit	42
2.9.2	Gesamt-RNA Isolierung mit der Ultrazentrifuge	43
2.9.3	Präzipitation von RNA	43
2.9.4	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	43
2.10	Reverse Transkription (RT)	44
2.10.1	Reverse Transkription mit MMLV-RTase	44
2.10.2	Reverse Transkription mit AMV-RTase	45
2.11	Polymerasekettenreaktion	45
2.12	Auftrennung von Nukleinsäuren mit der Agarose-Gelelektrophorese....	47

2.13	Reinigung von DNA durch Gelelektion	47
2.14	Sequenzierung von Nukleinsäuren	48
2.14.1	Sequenzierung eines PCR-Produktes	49
2.14.2	Sequenzierung klonierter DNA	50
2.15	Nachweis von löslichem CD95-Rezeptor (sCD95) mittels der Elisa- Technik	50
2.16	Herstellung von Serum	51
2.17	Proteinnachweis mittels Western Blot	54
2.17.1	Proteinextraktion	54
2.17.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	54
2.17.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.17.4	Western Blot	55
2.18	Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor	56
2.18.1	Ligation und Transformation	56
2.18.2	DNA-Extraktion aus dem Plasmid	57
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Basale Apoptoserate und Induzierbarkeit der Apoptose in Nierenzellkarzinomen	58
3.2	PCR-Amplifikation des CD95-Rezeptors	60
3.3	Nachweis des löslichen CD95-Rezeptors im Zellkulturüberstand	63
3.4	Nachweis des löslichen CD95-Rezeptors in Patientenseren	64
3.5	Proteinexpression des CD95-Rezeptors	67
3.6	PCR-Amplifikation des CD95-Liganden	68
3.7	Expression von LARD im Nierenzellkarzinom	69
3.8	Expression von Osteoprotegerin	72
3.9	Proteinexpression von Pro-Caspase-8	73
3.10	Expression der Caspaseinhibitoren FLIP _L und FLIP _S	74
3.11	Expression von Pro-Caspase-9	75
4	DISKUSSION	77
4.1	Bedeutung des CD95-Systems für das Nierenzellkarzinom	78
4.2	Bedeutung des löslichen CD95-Rezeptors in Patientenserum und Zellkulturüberstand	82

4.3	Die Bedeutung von LARD und dessen Spleißformen im Nierenzellkarzinom	83
4.4	Die Bedeutung von Osteoprotegerin (OPG) im Nierenzellkarzinom	85
4.5	Nachweis der Caspase-8 im Nierenzellkarzinom als zentrale Komponente der Apoptosesignal-Kaskade.....	87
4.6	Die Bedeutung der Apoptoseinhibitoren FLIP _S und FLIP _L im Nierenzellkarzinom	89
4.7	Die Bedeutung von Caspase-9 und der Spleißform Caspase 9s im Nierenzellkarzinom	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LITERATURVERZEICHNIS:	96
7	DANKSAGUNG	106
8	LEBENS LAUF	107
9	ABSTRACT	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Signalkaskade der Apoptose.....	9
Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Caspasenspaltung.	15
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Apoptosewege.	16
Abb. 1.4.: Schematische Darstellung des CD95-Rezeptors.....	18
Abb. 1.5.: Hauptweg der CD95-vermittelten Apoptose;.....	20
Abb. 1.6.: Apoptoseinduktion über LARD.....	21
Abb. 1.7.: Schematische Darstellung der 12 Spleißformen des Todesrezeptors LARD	23
Abb. 1.8.: Interaktion des membrangebundenen OPG-Liganden mit dem sekretorischen Rezeptor OPG	25
Abb. 1.9.: Caspase-8 Aktivierung:.....	28
Abb. 1.10.: Schematische Darstellung des rezeptorabhängigen und rezeptorunabhängigen Aktivierungsmechanismus von Caspase-9.....	30
Abb. 1.11.: Schematische Darstellung der Caspase-9 und der löslichen Spleißform Caspase-9s	31
Abb. 1.12.: Schematische Darstellung der beiden Apoptoseinhibitoren FLIP _L und FLIP _S	33
Abb. 1.13: Inhibition der Apoptose	34
Abb. 3.1.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von membrangebundenem CD95- Rezeptor und der löslichen Spleißform sCD95-Rezeptor im Nierenzellkarzinom.	61
Abb. 3.2.: Verteilung der Mittelwerte des Verhältnisses CD95/sCD95.	62
Abb. 3.3.: Konzentration des löslichen CD95-Rezeptors in Serum von Nierenzellkarzinompatienten vor und nach Nephrektomie und von gesunden Probanden.....	66
Abb. 3.4.: Darstellung der Expressionsstärke des CD95-Rezeptors mittels Western Blot Analyse.....	67
Abb. 3.5.: Gelelektrophoretische Auftrennung von RT-PCR-Produkten zum Nachweis des CD95-Liganden	69
Abb. 3.6.: Gelelektrophoretische Auftrennung von RT-PCR-Produkten zum Nachweis von LARD1a/b und den Spleißvarianten LARD2 und LARD3 ..	70
Abb. 3.7.: Vergleich der Verhältnisse der inhibitorischen Spleißformen LARD2 und LARD3 bezogen auf die proapoptotische Form LARD1.....	71

Abb. 3.8.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von OPG im Nierenkarzinomzelllinien.	73
Abb. 3.9.: Darstellung der Expressionsstärke der beiden Procaspase-8- Spleißformen 8a und 8b mittels Western Blot Analyse	74
Abb. 3.10.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von FLIP _L und FLIP _S im Nierenkarzinomzelllinien;	75
Abb. 3.11.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von Caspase-9 und der Spleißvariante Caspase-9s	76

1 Einleitung

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Niere beim Erwachsenen und erweist sich als äußerst therapieresistent gegenüber Zytostatika und Bestrahlung (Schäfer-Prokop, 1998). Da Chemotherapeutika und Radiatio ihre Wirkung zum Teil über die Induktion des programmierten Zelltodes, auch Apoptose genannt, entfalten (Fisher, 1994; Kerr et al., 1994), wird die Apoptose und einige ihrer Inhibitionsmechanismen im Nierenzellkarzinom in dieser Arbeit analysiert. Zu diesen Faktoren zählen inhibitorisch wirkende Spleißvarianten von Todesrezeptoren und Modulatoren der Caspasen-Kaskade innerhalb der Zelle (Abb. 1.1.).

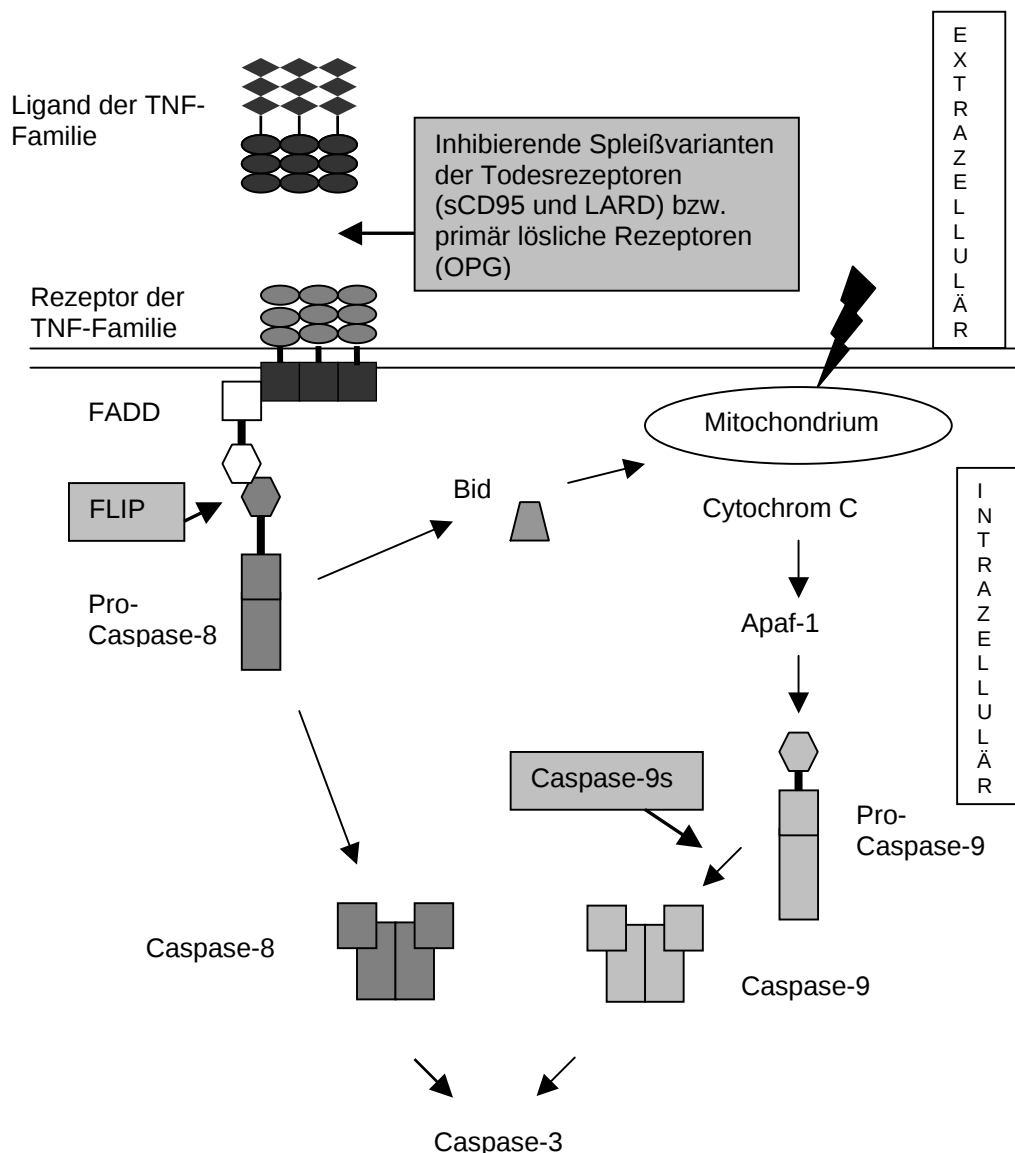


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Signalkaskade der Apoptose. Die grau unterlegten Felder geben die Position der Apoptosemodulatoren an, die in dieser Arbeit untersucht werden.

Die Betrachtung der Tumorbiologie soll mögliche Ansatzpunkte zur Überwindung der Therapieresistenz geben und damit als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Der Verdacht auf das Vorliegen eines Nierenzellkarzinoms erfolgt oft zufällig durch eine Sonographie (ca. 25% aller Nierenzellkarzinome) (Mickisch, 1998). Beschwerden wie Flankenschmerz und Hämaturie sind mit 50-60% aller Beschwerden zwar die häufigsten klinischen Symptome, treten allerdings erst auf, wenn der Tumor bereits eine beträchtliche Größe angenommen hat (Mickisch, 1998). Bei 25% der Patienten sind bereits bei Diagnosestellung Fernmetastasen vorhanden (Schäfer-Prokop, 1998). In diesem Stadium steht bisher keine erfolgversprechende kurative Therapie zur Verfügung.

Die Metastasierung erfolgt sowohl hämatogen in die Lunge, das Skelettsystem und in die Leber, als auch lymphogen in die aortalen und cavalen Lymphknoten (Schäfer-Prokop, 1998). Die 5-Jahres-Überlebensrate hängt sehr stark vom Tumorstadium ab. Bei einem pT1-Tumor leben fünf Jahre nach Erstdiagnose noch 95% der Patienten. Wird das Nierenzellkarzinom erst im Stadium pT4 entdeckt, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 10%. Im Durchschnitt leben die Patienten nach Metastasierung noch zwei Jahre (Mickisch, 1998).

Die Klassifizierung der Nierentumoren erfolgt nach pathomorphologischen Gesichtspunkten. (Thoenes et al., 1986; Störkel et al., 1999). Hierbei machen die klarzelligen, chromophilen und chromophoben Typen zusammen über 90% aller Nierenzellkarzinome aus und werden in dieser Arbeit genauer betrachtet. Des weiteren gibt es spindelzellig-pleomorphe, Duct-Bellini und neuroendokrine Nierenzellkarzinome (Thoenes et al., 1986; Störkel, 1999).

Das klarzellige Nierenzellkarzinom hat durch die Erhöhung des Glukose-6-Phosphatspiegels, die Aktivierung der Glykolyse und die Reduzierung der Glukoneogenese einen gestörten Glykogen- und Lipidmetabolismus, sodass sich diese Stoffe im Zellinneren ansammeln. Die entarteten Zellen haben ihren Ursprung im proximalen Tubulus. Das Tumorwachstum ist überwiegend solide,

und der Tumor kann sowohl sporadisch als auch im Rahmen des hereditären von-Hippel-Lindau-Syndroms auftreten (Störkel, 1999).

Das chromophile Nierenzellkarzinom ist ein tubulo-papillär wachsender Tumor, bei dem histologisch basophile und eosinophile Zellen charakteristisch sind. Auch diese Zellen stammen ursprünglich aus dem proximalen Tubulus (Störkel, 1999).

Im Gegensatz dazu zeigt das chromophobe Nierenzellkarzinom Differenzierungsmerkmale von Schaltzellen der Sammelrohre. Die hellen Zellen sind mitochondrienreich (Thoenes et al., 1986; Störkel, 1999).

Die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms erweist sich als außergewöhnlich schwierig. Während man bei lokal begrenzten Tumoren kurativ operieren kann, ist dies bei fortgeschrittenen Stadien nicht mehr möglich (Schmitz-Dräger et al., 1998). Der Tumor ist gegen eine große Zahl von Zytostatika therapierefraktär (Schmitz-Dräger et al., 1998). Floxuridin und 5-Fluorouracil zeigen mit 10% noch die beste Remissionsrate (Mickisch, 1998). Eine Radiatio hat nur bei lokal begrenzten Rezidiven oder symptomatischen Metastasen eine palliative Bedeutung (Schmitz-Dräger et al., 1998) und wird beispielsweise bei schmerzhaften Knochenmetastasen eingesetzt.

Ein weiterer Therapieversuch liegt in einer Immuntherapie. So wurden in einer Studie mit 400 Patienten, die an einem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom erkrankt waren, Interferon- α (INF- α) bei 13% erfolgreich eingesetzt (Mickisch, 1998). Die besten Ergebnisse liefert zur Zeit Interleukin-2 (IL-2) als Monotherapie oder in Verbindung mit Lymphozyten-aktivierten-Killerzellen (LAK) oder Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten (TIL). Hierbei ergibt sich eine objektive Besserung des Befundes von 5% (nur IL-2) bis 33% (IL-2 + LAK). Allerdings kann die Lebenserwartung durch diesen immuntherapeutischen Ansatz nicht verlängert werden (Mickisch, 1998).

Die Ursachen der Chemo- und Bestrahlungstherapieresistenz sind vielfältig und bislang erst in Ansätzen entschlüsselt. Den Tumorzellen stehen nach heutigen Vorstellungen jedoch eine ganz Reihe von Resistenzmechanismen zur Verfügung:

- Das Nierenzellkarzinom zeigt eine Überexpression des “Multi-Drug-Resistance” (MDR-1)-Gens (Volm et al., 1993), das für die Expression des Glykoproteins p170 verantwortlich ist. Dieses bewirkt die aktive Ausschleusung von Zytostatika (z. B. Vinkaalkaloide, Taxane, Topotecan) aus dem Zellinneren und damit eine Reduktion der intrazellulären Zytostatikakonzentration (German, 1996).
- Die langsame basale Wachstumsrate des Nierenzellkarzinoms, bei der ein großer Anteil der Zellen in der G0-Phase ruht, mindert die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika, da diese bevorzugt in der Synthese-Phase des Zellzyklus angreifen (Schmitz-Dräger et al., 1998).
- Die Überexpression der Glutathion-S-Transferase, die die Toxizität der Zytostatika durch Konjugation herabsetzt (Volm et al., 1993).
- Die Expression der Topoisomerase II, wodurch die DNA-Replikation durch Doppelstrangbrüche gestört wird (Volm et al., 1993).

Volm konnte zeigen, dass 74-77% der untersuchten Nierenzellkarzinome einen, über 50% zwei und rund 30% drei dieser Resistenzmechanismen aufwiesen (Volm et al., 1993). Dagegen wurde die Inhibition der Apoptose als Ursache der Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms bislang vergleichsweise wenig beachtet.

Kerr wies auf die Bedeutung der Apoptose bei der Chemotherapie und der Bestrahlung hin (Kerr et al., 1994). Der genaue Wirkmechanismus, über den die Apoptose durch Zytostatika aktiviert wird, ist jedoch noch unbekannt. Ebenso ungeklärt ist, weshalb einige Karzinomzellen besonders empfindlich auf derartige Noxen reagieren. Das unterschiedliche Verhalten bei der Proliferation, während der DNA-Reparatur, auf Hypoxie und bei der Angiogenese sind zwar wichtige Faktoren, können aber diese Frage nicht ausreichend beantworten (Fisher, 1994).

Es werden Apoptose-Inhibitionsmöglichkeiten der Tumorzellen postuliert, die die Therapieresistenz mitbeeinflussen (Krammer 1997).

In dieser Arbeit werden einige Inhibitionsfaktoren der Apoptose am Beispiel des außergewöhnlich therapieresistenten Nierenzellkarzinoms untersucht.

1.2 Die Apoptose

Die Apoptose wurde bereits 1972 von John Kerr entdeckt. Er beobachtete die typischen morphologischen Zeichen:

- Chromatinkondensation an der nukleären Membran
- Zellschrumpfung
- DNA-Degradation
- Abschnürung der Kernbruchstücke
- Auflösung der Zelle in membranumhüllte Kompartimente, die von Makrophagen ohne Entzündungsreaktion phagozytiert werden.

Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese (z. B.: Entstehung der Fingerzwischenräume), bei der Ausbildung des Immunsystems und bei der Elimination entarteter Zellen (Kerr et al., 1972; Krammer, 1997).

Während der Ausbildung des Immunsystems erfolgt eine Selektion von T- und B-Lymphozyten und Beseitigung autoreaktive Zellen durch den programmierten Zelltod. CD4-positive T-Helferzellen regulieren ihre CD95-Rezeptor- und -Ligandenexpression nach der Stimulation durch ein körpereigenes Antigen herauf. Durch die Interaktion von Rezeptor und Ligand können sie sich sowohl selbst als auch gegenseitig durch Apoptose töten (sog. Fratizidmodell) (Krammer 1997). Auf diese Weise werden Autoimmunerkrankungen vorgebeugt, da Lymphozyten, die gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, beseitigt werden (Krammer, 1997).

Die Apoptose spielt auch eine wichtige Rolle bei der Elimination von mutierten Zellen, die ständig durch äußere und innere Noxen im Körper entstehen (Kerr et al., 1994). Durch eine verringerte oder ineffektive Apoptose wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und –untergang gestört. Es kommt zu einer tumorösen Entartung des Gewebes, wobei die normalen Regelmechanismen der Homöostase außer Kraft gesetzt sind (Binder et al., 1996).

Eine Möglichkeit der Induktion der Apoptose besteht in einer Rezeptor-Liganden-Interaktion. So sind die Rezeptoren der TNF-Gruppe (z.B. TNF-R2,

CD95-R, LARD, DR4, DR5) membranständige Proteine des Typs I (Bodmer et al., 1997). Sie besitzen in ihrer extrazellulären Domäne, welche vom N-terminalen Ende gebildet wird, ein bis sechs hochkonservierte cysteinreiche Motive. Diese Regionen bestehen aus 40 Aminosäuren und sind für die Bindung des Liganden zuständig (Bodmer et al., 1997). Intrazellulär befindet sich eine Todesdomäne (Death Domain DD), die das Bindeglied zu den in der Zelle liegenden Apoptosefaktoren darstellt.

Die korrespondierenden Liganden wie beispielsweise TNF, CD95-L, TRAIL und Apo3-L sind Typ-II-Transmembranproteine (Bodmer et al., 1997). Sie bilden ihre extrazelluläre Domäne durch den C-terminalen Bereich. Diese Region ist vergleichsweise lang (140-215 Aminosäuren) und dient der Bindung an den korrespondierenden Rezeptor, wohingegen der zytoplasmatische Bereich nur eine relativ kurze Aminosäuresequenz von 10-80 Aminosäuren umfasst (Banner et al., 1993).

Durch die Bindung der Liganden an die Rezeptoren erfolgt eine Trimerisierung der Rezeptoren, die die Rekrutierung von Adaptermolekülen an die intrazelluläre Todesdomäne der Rezeptoren und die Ausbildung eines Death Inducing Signaling Complex (DISC) zur Folge hat (Scaffidi et al., 1998).

Der nächste wichtige Schritt stellt die Aktivierung der Initiator-Caspasen -2, -8, -9 und -10 dar (Liu et al., 2000). Der Name Caspase setzt sich aus der Funktion des Proteins zusammen: Es handelt sich um eine Cysteinprotease, die ihr Substrat spezifisch an einem **A**spartatrest spaltet. Hierbei wird zunächst eine Prodomäne variabler Größe abgespalten. In einer weiteren proteolytischen Spaltung wird eine sog. große Untereinheit von einer kleinen Untereinheit getrennt. Jeweils zwei große Untereinheiten lagern sich aneinander und bilden so ein aktives katalytisches Zentrum für die Spaltung weiter distal gelegener Effektor-Caspasen. Die kleinen Untereinheiten lagern sich an die großen Einheiten an und vervollständigen die Protease (Abb. 1.2.) (Medema, 1997; Bossy-Wetzel et al., 1998).

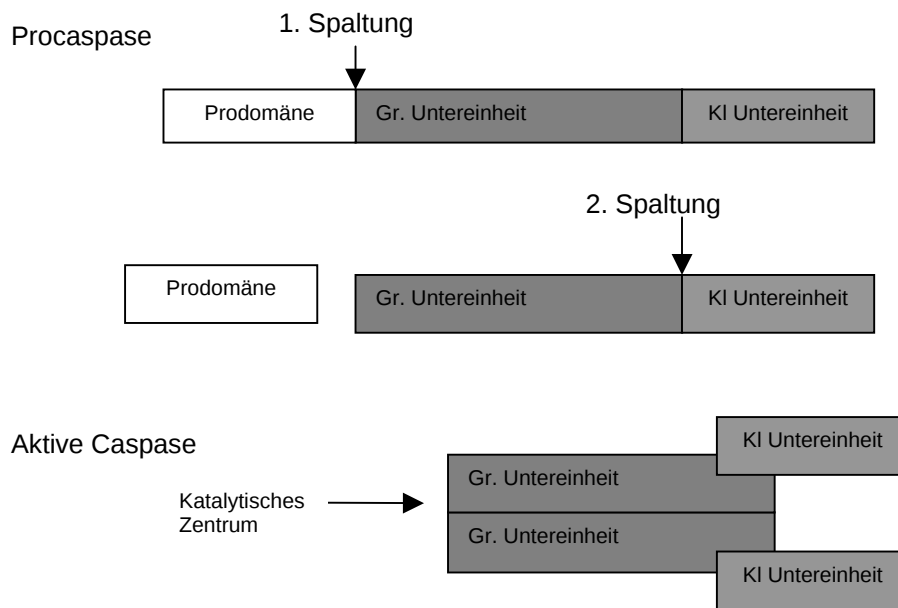


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Caspasenspaltung. Aus zwei Pro-Caspasen wird nach zwei proteolytischen Spaltungen eine aktive Caspase zusammengesetzt.

Darüber hinaus kann die Apoptose auch durch die Aktivierung des mitochondrialen Weges mit einer nachfolgenden Cytochrom C-Ausschüttung eingeleitet werden (Bossy-Wetzel et al., 1998). Es folgt die proteolytische Spaltung der Caspase-9, die weitere Caspasen aktiviert und letztendlich ebenfalls zur Apoptose führt (Susin et al., 1997). Der genaue Mechanismus der Mitochondrienaktivierung ist noch nicht bekannt. Bisher wird angenommen, dass bei einigen Zelllinien (z. B. Fibroblasten) Zytostatika und Bestrahlung eine direkte Wirkung auf die Mitochondrien haben, wohingegen bei anderen Zellarten (z. B. Hepatozyten) die Apoptose durch Zytostatika über die Aktivierung des CD95-Systems induziert wird (Abb. 1.3.) (Ochs et al., 2000). Der rezeptorabhängige Apoptoseweg ist über Bid mit dem mitochondrialen Weg verknüpft, indem die aktive Caspase-8 Bid spaltet, welches dann die Cytochrom C-Ausschüttung der Mitochondrien induziert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998) (Abb. 1.3).

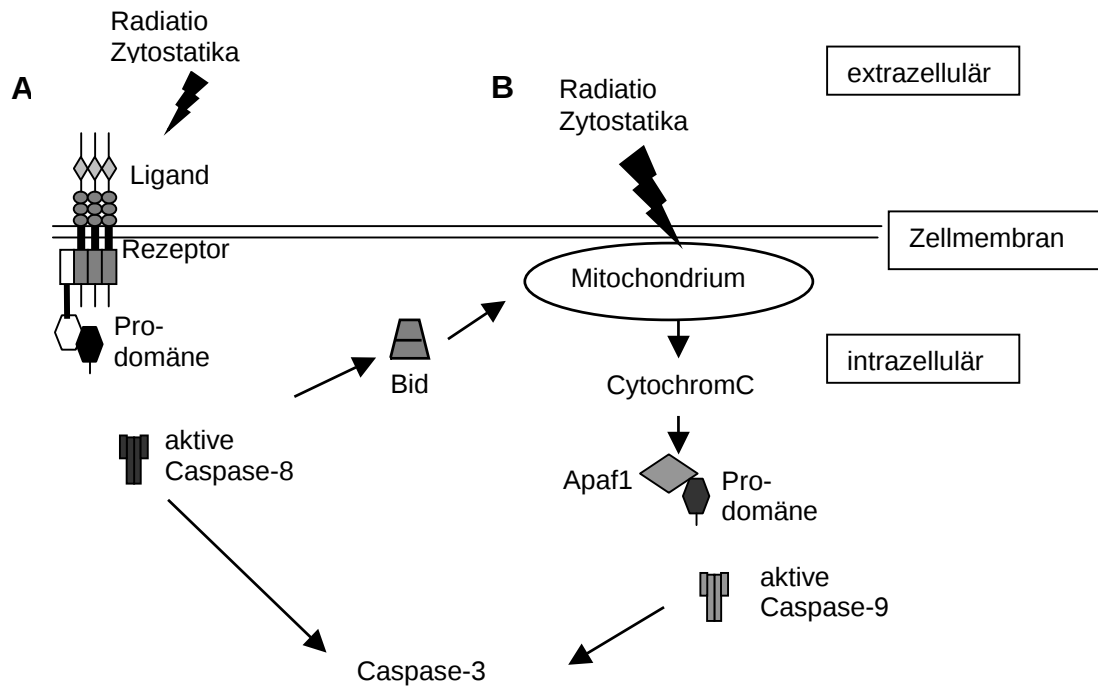


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Apoptosewege.
 A: rezeptorvermittelte Apoptose
 B: Apoptoseinduktion über Mitochondrienaktivierung z. B. durch Radiatio oder Zytostatika. Verbindung beider Wege durch Bid.

Fulda et al. zeigten, dass eine Chemotherapie besonders das CD95-System aktiviert (Fulda et al., 1997). Durch die zytostatikabedingte Hochregulierung des CD95-Rezeptors und -Liganden wird ein caspasenvermittelter Apoptosemechanismus in Gang gesetzt. Veränderungen oder Defekte des Liganden, des Rezeptors oder der weiteren Signaltransduktion können zu einer Therapieresistenz führen, und damit den Therapieerfolg mindern. Hier kommt sowohl die fehlende Hochregulation von Rezeptor und Ligand in Betracht, als auch die Induktion von Apoptose-inibierenden Spleißformen sämtlicher, an der Todeskaskade beteiligte Komponenten und die Aktivierung von inhibitorisch wirkenden Faktoren, die auf sehr unterschiedlichen Ebenen des Apoptosewegs limitierend eingreifen können (Cheng et al., 1994; Screatton et al., 1997; Seol et al., 1999).

Eine Störung des programmierten Zelltodes kann eine Resistenz der Karzinomzellen gegenüber Zytostatika, Immuntherapie und Bestrahlung hervorrufen (Collins et al., 1991; Fisher, 1994; Fulda et al., 1997; Collecchi et al., 1998).

Das Nierenzellkarzinom zeichnet sich durch eine besondere Resistenz gegenüber den bisher erprobten Chemotherapien und Bestrahlungsverfahren aus (Schmitz-Dräger et al., 1998). Um der Frage nachzugehen, ob die Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms durch eine Hemmung des apoptotischen Zelltodes bedingt ist, werden eine Reihe von Apoptoseinhibitionsfaktoren sowohl bei Nierenkarzinom-Zelllinien, als auch bei einigen Tumorpatienten analysiert, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Zu diesen untersuchten inhibierenden Faktoren zählen die Apoptoserezeptoren **CD95** und **LARD** (Abb. 1.1.), die durch Zytostatika und Bestrahlung über eine Signalkaskade das Todessignal an das Zellinnere weitergeben. Hierbei interessieren besonders lösliche Spleißformen **sCD95**, **LARD2** und **LARD3**, die mit dem membrangebundenen Rezeptor um die Bindung mit dem jeweiligen Liganden kompetitieren und dadurch die Apoptose inhibieren.

Darüber hinaus wird das Expressionsmuster von **OPG**, einem sekretorischen Rezeptor für TRAIL, der diesen Liganden vor dessen Apoptose-induzierender Interaktion mit DR4 und DR5 abfangen kann, analysiert (Emery et al., 1998).

Schließlich werden die antiapoptotischen Regulatorproteine **Caspase-9s** und **FLIP_{LS}** untersucht. Sie inhibieren die intrazelluläre Signaltransduktion, indem sie die Aktivierung der Caspasen-Kaskade unterbinden. Dabei wirken sie an strategisch wichtigen Punkten des programmierten Zelltodes, von denen aus sie mehrere Apoptosewege kontrollieren können.

Diese Daten sollen mit den Ergebnissen aus funktionellen Studien zum Apoptoseverhalten des Nierenzellkarzinoms verglichen werden, um einen Hinweis auf die Ursache der Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms zu erhalten.

1.3 Das CD95-System

Das CD95-System zählt zu den bekanntesten Apoptose-induzierenden Systemen. Der CD95-Rezeptor (Fas, [Trauth et al., 1989]; Apo1, [Yonehara et al., 1989]) gehört zu der Familie der TNF-Rezeptoren (Itho et al., 1991; Oehm

et al., 1992). Yonehara charakterisierten ihn 1989 als ein 335 Aminosäure langes Protein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa, das auf Chromosom 10q23 lokalisiert ist (Yonehara et al., 1989). Trauth und Mitarbeiter bestätigte diese Ergebnisse durch unabhängige Analysen (Trauth et al., 1989). Es handelt sich dabei um ein Typ I-Transmembranprotein, das aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne mit einer sogenannten Todesdomäne (**Death-Domain, DD**) besteht (Abb. 1.4). Der extrazelluläre Bereich weist drei für die TNF-Familie typischen cysteinreichen Regionen auf, die für die Ligandenbindung notwendig sind (Oehm et al., 1992, Itho et al., 1991). Durch alternatives Spleißen können lösliche Formen des Rezeptors exprimiert werden (Cheng et al., 1994).

Die Form CD95TMDel, der das Exon 3, d.h. die Transmembrandomäne fehlt, und somit als lösliches Variante vorliegt (Abb. 1.4.), wird in dieser Arbeit genauer untersucht und im weiteren als sCD95 (**s**oluble **CD**95) bezeichnet.

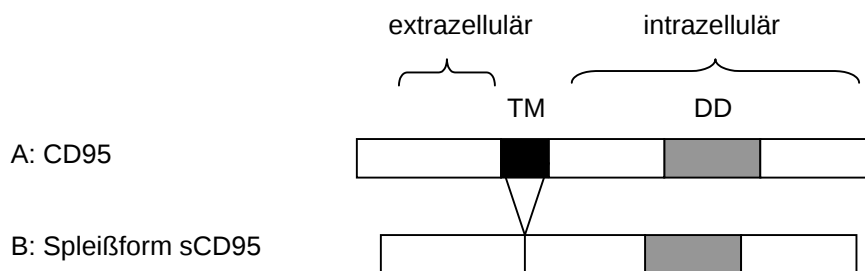


Abb. 1.4.: Schematische Darstellung des CD95-Rezeptors
TM = transmembrane Domäne, DD = Death Domain

Der lösliche CD95-Rezeptor kann den Liganden kompetitiv binden und so die Signaltransduktion verhindern, da er keine Verbindung zu den intrazellulären Apoptosekomponenten hat (Sugahara et al., 1997). Auf diese Weise wird einerseits die Tumorentstehung begünstigt, andererseits kann auch die Therapie mit Zytostatika erschwert werden, da diese Zytostatika ihre Wirkung unter anderem über die Aktivierung von CD95 entfalten (Fulda et al., 1997).

Bei Patienten mit Karzinomen wie z. B. Blasen-, Ovarial- und Lungentumoren konnte gezeigt werden, dass sich im Serum ein erhöhter Gehalt des sCD95-Proteins befand. Außerdem konnte im Zellkulturüberstand von Tumorzellkulturen der lösliche Rezeptor nachgewiesen werden (Midis et al., 1996).

Der CD95-Ligand ist ein Typ II-Transmembranprotein der TNF-Familie (Suda et al., 1993). Er ist vor allem in immunprivilegiertem Gewebe der vorderen Augenkammer (Griffith et al., 1995) sowie auf Lymphozyten zu finden (Debatin, 1996). Im Gegensatz zum Rezeptor kann der Ligand durch Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgespalten werden und so als lösliche Form an die Umgebung abgegeben werden (Tanaka et al., 1996). Auch der lösliche Ligand kann Apoptose induzieren (Suda et al., 1993), ist jedoch weit weniger aktiv (Schneider et al., 1998).

Die Trimerisierung des Rezeptors, z.B. durch den CD95-Liganden oder agonistisch wirkende Antikörper (CH11, [Trauth et al., 1989]), führt zur Ausbildung eines „**death-inducing-signaling-complex**“ (DISC) (Kischkel et al., 1995). Dieser setzt sich aus den Todesdomänen von drei CD95-Rezeptoren und der Todesdomäne des „CD95-assoziierten Proteins mit Todesdomäne“ (**Fas-associated protein with death domain**, FADD) zusammen (Boldin et al., 1996). Die Todeseffektordomäne (**death-effector-domain**, DED) von FADD wiederum interagiert mit der DED von Caspase 8 (= Flice, **FADD like ICE**) und führt zu deren Aktivierung durch proteolytische Spaltung (Abb. 1.5.) (Boldin et al., 1996). Es folgt eine ganze Kaskade von Caspaseaktivierungen, die im apoptotischen Zelltod enden (Nagata, 1997).

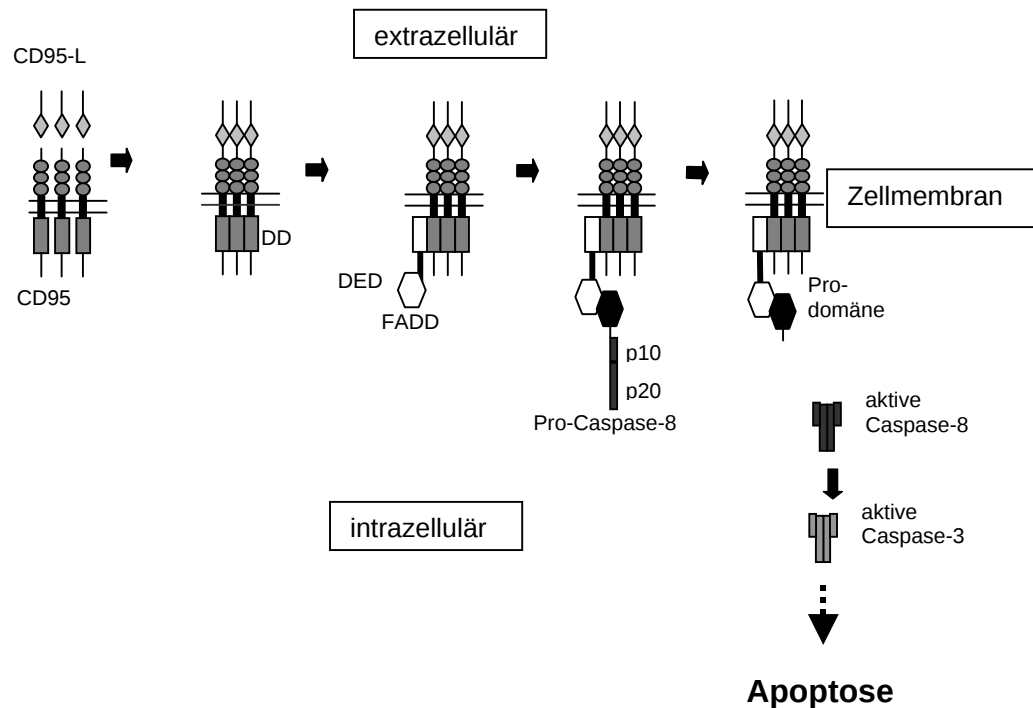


Abb. 1.5.: Hauptweg der CD95-vermittelten Apoptose;
DD= Todesdomäne, DED= Todeseffektordomäne

Ein Aspekt in der vorliegenden Arbeit ist es, die Nierenkarzinom-Zelllinien bezüglich ihrer Expression von CD95-Rezeptor und –Ligand sowie des löslichen CD95-Rezeptors zu charakterisieren, da hierzu bisher keine Daten vorliegen. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob im Serum von Nierentumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Konzentration von sCD95 vorliegt, welche die Apoptoseinduktion durch das Immunsystems oder Zytostatika beeinträchtigen könnte.

1.4 Der lymphozyten-assoziierte Todesrezeptor (LARD)

Ein weiteres Mitglied der TNFR-Familie ist der Lymphozyten-assoziierte Todesrezeptor LARD (**L**ymphocyte **A**ssociated **R**eceptor of **D**eath, Screaton et al., 1997). Von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt, erhielt er viele Synonyme: Todesrezeptor 3 (Death-Receptor 3, Warzocha et al., 1998), Apo3 (Marsters et al., 1996), TRAMP (**T**yrosine-rich **A**cidic **M**atrix **P**rotein, Bodmer et al., 1997). Hier wird im Weiteren die Bezeichnung LARD verwendet.

Die Aktivierung des LARD-Rezeptors erfolgt durch die Bindung des LARD-Liganden Apo3L, der zu einer Oligomerisierung des Rezeptors führt (Marsters et al., 1998). Daraufhin interagiert die Todesdomäne von LARD mit der Todesdomäne von FADD mit Hilfe des Adaptermoleküls TRADD (TNF-R1 associated death domain protein). Die Aktivierung der Caspase-8 und damit der Caspasen-Kaskade führen letztendlich zur Apoptose (Bodmer et al., 1997) (Abb. 1.6).

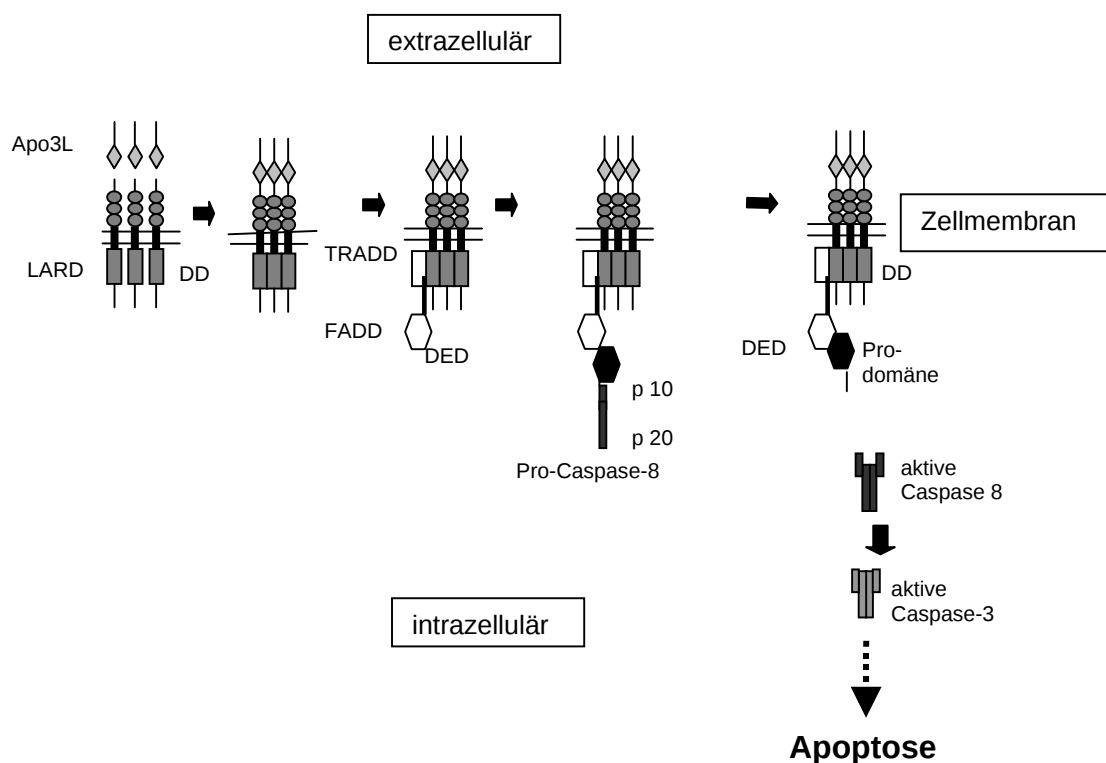


Abb. 1.6.: Apoptoseinduktion über LARD/Apo3L. DD= Todesdomäne, DED= Todeseffektordomäne

Ähnlich wie beim CD95-Rezeptor kann die Funktion von LARD durch alternatives Spleißen alteriert werden:

LARD1 ist ein 3,5 - 4 Kilobasen langes Typ-I-Transmembranprotein bestehend aus einer extrazellulären (Exon 1-6), einer transmembranen (Exon 7) und einer intrazellulären Region (Exon 8-10) mit Todesdomäne (Exon 10). Da LARD1 alle funktionellen Einheiten aufweist, ist dieser Rezeptor Apoptose-induzierend. Es sind zwei Unterformen von LARD1 bekannt: LARD1a und LARD 1b. Diese unterscheiden sich durch eine Insertion von drei Basenpaaren (CAG) an Position 709 (Screatton et al., 1997) (Abb. 1.7).

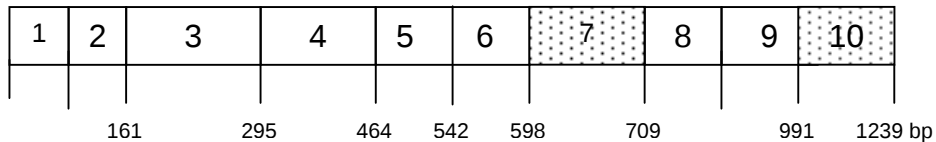
Durch alternatives Spleißen können auf mRNA-Ebene 12 Isoformen entstehen, die unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen (Abb. 1.7.) (Screaton et al., 1997). Abgesehen von LARD1 und LARD8 existieren alle Spleißformen in einer löslichen Form und können möglicherweise funktionell aktiv sein, d. h. mit dem Liganden interagieren und die Apoptose induzieren (Screaton et al., 1997). Es lässt sich also folgende Einteilung des LARD Rezeptors treffen:

- Die proapoptotischen Formen LARD**1a**, **1b** und 8
- Die löslichen und eventuell inhibitorischen Formen LARD**2**, **3**, 4, 5, 6, 7, 9, 10 und 11.

A: funktionelle Einheiten



B: Exone



C: Spleißformen

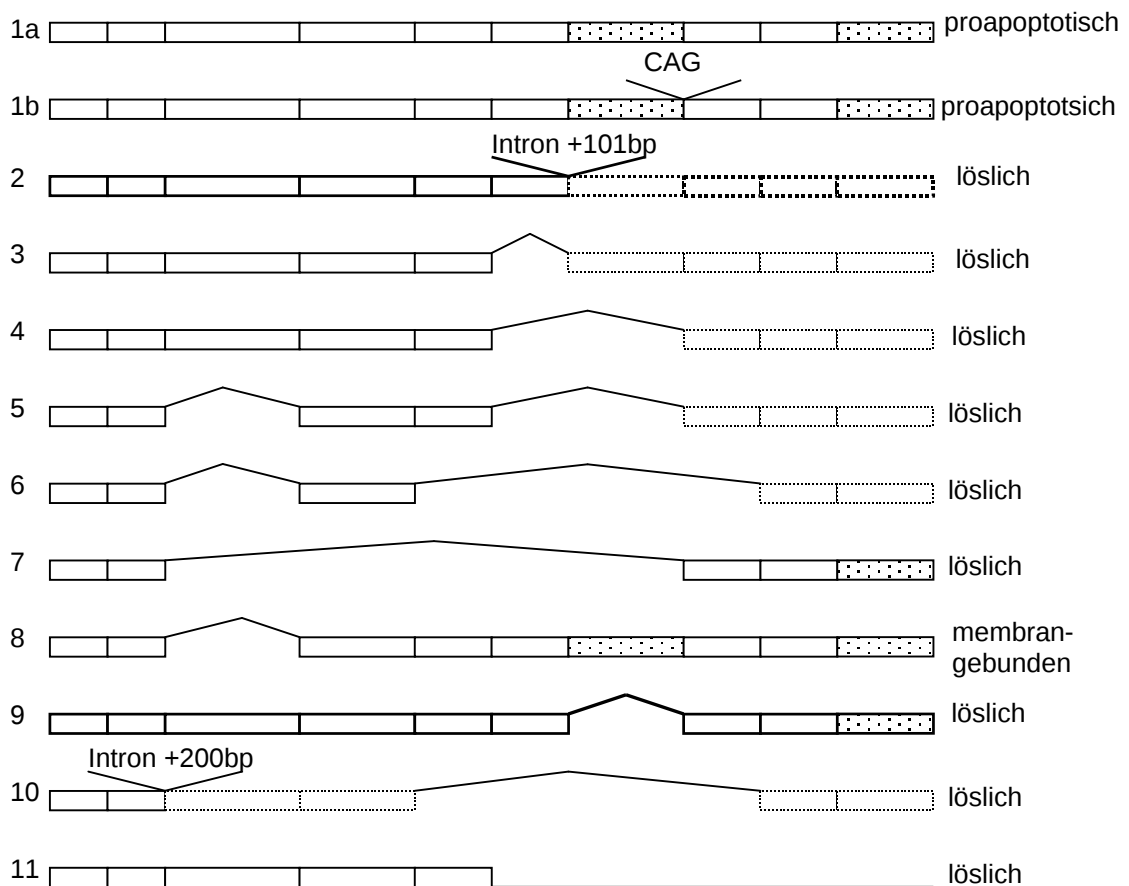


Abb. 1.7.: Schematische Darstellung der 12 Spleißformen des Todesrezeptors LARD (nach Screaton et al., 1997).

A: Darstellung der Funktionseinheiten von LARD

B: Darstellung der Exongrenzen von LARD

C: Darstellung der Spleißformen; die gestrichelt dargestellten Exone werden nicht als Proteine translatiert.

Die Größenangaben sind in Basenpaaren (=bp); TM= Transmembrandomäne, DD= Todesdomäne, NGFR=nerve growth factor receptor

Eine entscheidende Bedeutung von LARD liegt in der Ausbildung des Immunsystems, indem es die Lymphozytenproliferation kontrolliert (Screaton et al, 1997). Hier fällt auf, dass unstimulierte B- und T-Lymphozyten die aktive und vollständige Spleißform LARD1 in nur sehr geringer Menge exprimieren, nach Aktivierung der Lymphozyten jedoch ein deutlicher Anstieg von LARD1 beobachtet wird, wohingegen die anderen Spleißformen zurückgedrängt werden (Screaton et al., 1997; Warzocha et al., 1998).

Eine mRNA-Expression von LARD ist bisher nur für folgende Zellarten beschrieben worden: T- und B-Lymphozyten, Milz, Thymus, Dünndarm, Kolon, fetale Lunge und fetale Niere (Screaton et al., 1997). Außerdem wurde der Rezeptor in Gewebeproben von elf follikulären Lymphomen und bei vier Leukämiezelllinien (Mieliki, Reh, RL und Jurkat) nachgewiesen (Warzocha et al., 1998). Für das humane Nierenzellkarzinom liegen bisher keine Daten zum Rezeptorstatus von LARD vor. Mit LARD1, LARD2 und LARD3, deren Expression mittels einer RT-PCR analysiert wird, werden in dieser Arbeit drei weitere Faktor der Apoptose-Inhibition am Beispiel des Nierenzellkarzinoms untersucht.

1.5 Osteoprotegerin und seine Liganden

Auch **Osteoprotegerin** (OPG), das 1997 von Simonet entdeckt wurde, ist ein Mitglied der TNFR-Familie. Der strukturelle Aufbau ist für diese Rezeptorfamilie typisch: vier cysteinreiche Domänen im C-terminalen Bereich und zwei Todesdomänen am N-terminalen Ende. Auffällig ist jedoch, dass die Transmembranregion fehlt, so dass es sich um einen sezernierten Rezeptor handelt. OPG ist ein Glykoprotein mit einem Gewicht von 55 kDa, welches sowohl als Monomer, als auch als Homodimer nachweisbar ist (Simonet et al., 1997).

Im Gegensatz dazu ist der Osteoprotegerin-Ligand (OPG-L, auch ODF = **O**steoclast **D**ifferentiation **F**actor, TRANCE = **T**NF-**R**elated **A**ctivation-induced Cytokine, RANKL = **R**eceptor **A**ctivator of **NF**κ**B**-Ligand) ein

membrangebundenes Protein, das durch Metalloproteasen in eine lösliche Form überführt werden kann (O'Connell et al., 1996).

In Versuchen an transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen OPG und seinem Liganden das Knochengewebe vor Destruktion durch Osteoklasten schützt und eine Splenomegalie induziert (Emery et al., 1998) (Abb. 1.8).

Wie aus der Abb. 1.8 zu ersehen ist, wird der Knochenabbau durch die Interaktion von OPGL mit RANK (Receptor Activator of NF- κ B) induziert. Die Bindung von RANK an OPGL führt über die Aktivierung von NF- κ B zur Differenzierung der Osteoklasten aus Vorläuferzellen und zur Stimulation ruhende Osteoklasten (Emery et al., 1998). Durch die Bindung des löslichen Rezeptors OPG an den membranständigen Liganden OPGL kann die Osteoklastendifferenzierung verhindert werden, so dass es zu vermehrtem Knochenaufbau durch ein Übergewicht an Osteoblasten kommt (Emery et al., 1998; Simonet et al., 1997).

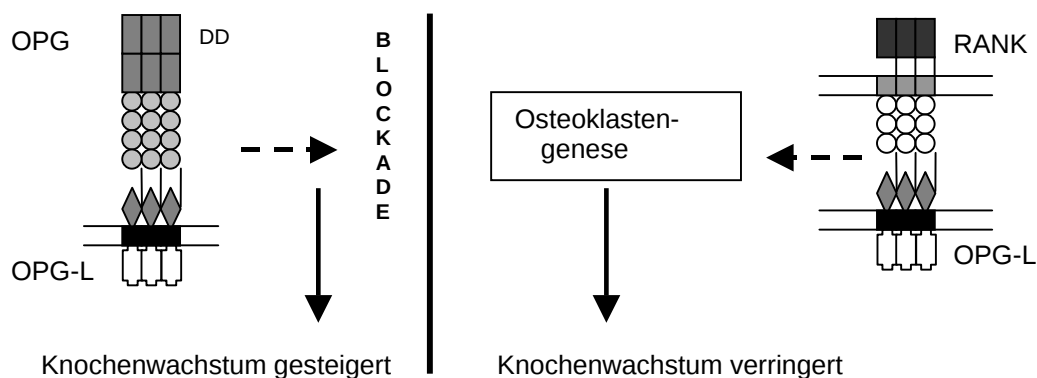


Abb. 1.8.: Interaktion des membrangebundenen OPG-Liganden mit dem sekretorischen Rezeptor OPG (= Osteoprotegerin); DD= Todesdomäne

Inflammatorische Zytokine wie z. B. IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17 können in Osteoblastenzelllinien die OPG-Synthese hemmen und die OPGL-Synthese steigern, während INF- γ , IL-4, IL-13 und IL-18 keinen Effekt auf die OPG-Synthese haben (Nakashima et al., 2000). Lediglich TGF- β kann die OPG-Expression steigern, hat jedoch keinen Einfluss auf OPGL (Nakashima et al., 2000). Die Auswirkungen dieser Synthesemodulationen auf das Knochengewebe lässt sich anhand der Abb. 1.8. erkennen: Die vermehrte

OPG-Produktion führt zu einer verstärkten Konkurrenz mit RANK um den Liganden, wodurch eine Osteoklastenaktivierung in zunehmendem Maße verhindert werden kann und zu einer Knochengewebeproliferation führt.

Darüber hinaus dient TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) als Ligand für OPG (Emery et al., 1998). Physiologisch kann TRAIL durch Interaktion mit den membranständigen Rezeptoren DR4 und DR5 die Apoptose wirkungsvoll einleiten (Emery et al., 1998). Das Apoptosesignal wird über die Adaptermoleküle TRADD und FADD an die Caspase-8 weitergeleitet, die die Caspasen-Kaskade aktiviert (Schneider et al., 1998). Die TRAIL-induzierte Apoptose ist Gegenstand intensiver Forschung, da sie eine Alternative zum CD95-abhängigen Weg darstellt. In einigen Zelllinien (Bronchial-Ca A549, Zervix-Ca ME 180 und histiozytischem Lymphom U937) erwies sich die Apoptose-Induktion über TRAIL sogar als wirkungsvoller (Pitti et al., 1996).

Indem OPG als sog. Decoy-Rezeptor von TRAIL fungiert, kann ein entscheidender Weg des programmierten Zelltodes inhibiert werden (Emery et al., 1998).

Durch Northern-Blot-Analysen konnte bisher in folgenden humanen Geweben OPG nachgewiesen werden: Herz, Lunge, Niere und Plazenta, sowie in einigen hämatopoetischen und immunologischen Geweben (Simonet et al., 1997). Dagegen wurde die Expression von OPG in soliden Tumoren bisher nicht untersucht.

In dieser Arbeit erfolgt eine Analyse der Expression von OPG im humanen Nierenzellkarzinom.

1.6 Signaltransduktion über Caspasen

Nach der initialen Aktivierung der Todesrezeptoren CD95, LARD, TRAIL u. a. folgt die Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Fernandes-Alnemri et al., 1996). Diese wird durch die proteolytische Spaltung von Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) eingeleitet und mit der Aktivierung von Effektor-Caspasen (Caspase-3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 und -13) fortgeführt. Am Ende steht der apoptotische Zelltod (Liu et al., 2000).

1.6.1 Caspase-8

Caspase-8, von Marta Muzio und Mark Boldin 1996 gleichzeitig entdeckt, hat eine Vielzahl von Namen: FLICE, MACH, Mch5. Es handelt sich hierbei um ein 55 kDa großes Protein mit einer cDNA-Sequenz von 1437 Basenpaare als offener Leserahmen (Muzio et al., 1996). Auf mRNA-Ebene können acht Isoformen entstehen. Es werden jedoch nur zwei Formen, Caspase-8a und -8b, als Protein exprimiert. Die beiden Proteinvarianten unterscheiden sich in 15 Aminosäuren im Bereich der Prodomäne, welche Caspase-8b fehlen. Diese Deletion hat jedoch keinen Aktivitätsverlust zur Folge (Scaffidi et al., 1997).

Caspase-8 liegt zunächst als Proenzym vor und wird unter anderem durch die Bindung an FADD aktiviert. Durch eine erste proteolytische Spaltung an Asp374 entstehen die zwei Zwischenprodukte p43 und p12, die aber so schnell prozessiert werden, dass sie mit den angewandten Methoden bisher kaum nachweisbar sind. Eine zweite Spaltung an Asp216 und Asp384 trennt die Prodomäne p26 vom aktiven Teil der Caspase. Dieser wird in die Untereinheiten p18 und p10 unterteilt. Die p18-Untereinheiten zweier Caspasen lagern sich aneinander, während sich die p10-Untereinheiten von außen anlegen (Medema et al., 1997) (Abb. 1.9).

Die proteolytisch aktive Domäne wird von den beiden großen Untereinheiten gebildet, während die Prodomäne an FADD gebunden bleibt (Medema et al., 1997). Die Prozessierung der Caspase ist nur möglich, wenn FADD an einen aktivierten Rezeptorkomplex gebunden ist. Freies FADD kann zwar auch mit der Caspase interagieren, aber die proteolytische Spaltung und damit die Aktivierung bleibt aus (Medema et al., 1997).

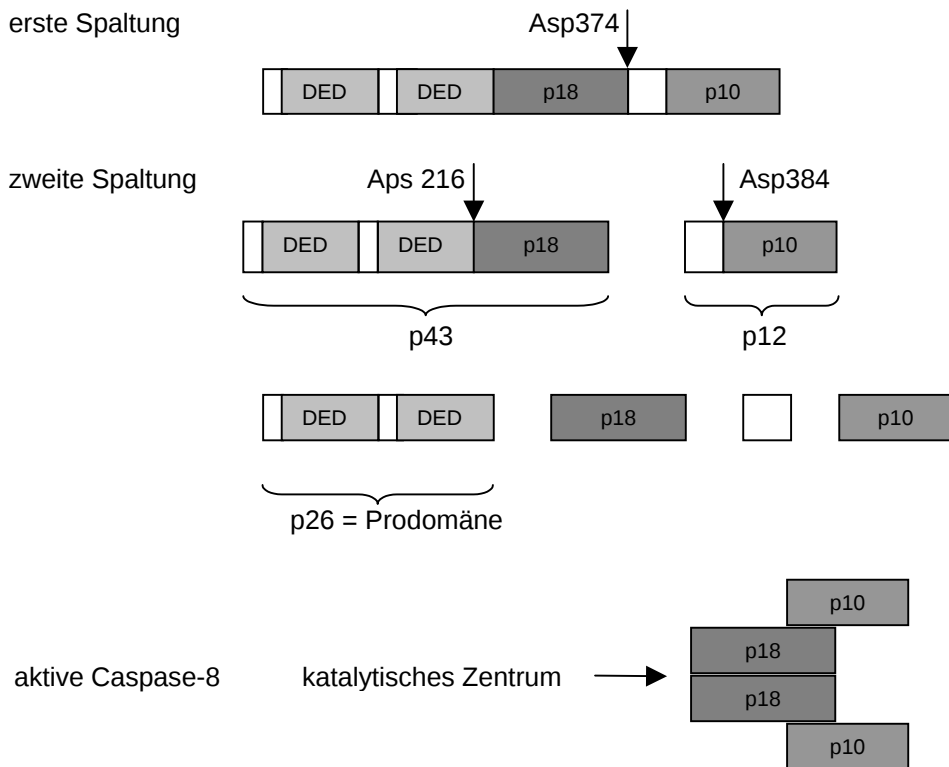


Abb. 1.9.: Caspase-8 Aktivierung: erste Spaltung an Asp374 mit Entstehung der Untereinheiten p43 und p12, Trennung der Prodomäne (p26) von den aktiven Bereichen (p10 und p18) durch die zweite Spaltung an Asp216 und Asp384; aktive Caspase-8, zusammengesetzt aus je zwei p10- und p18-Untereinheiten
DED = Death effector Domain

Nach der Aktivierung der Caspase-8 durch einen Todesrezeptor (z.B. CD95 oder LARD) (Muzio et al., 1996) stehen zwei unterschiedliche Wege der weiteren Caspasen-Aktivierung zur Verfügung (Abb. 1.1).

Zum einen können die Effektor-Caspasen -3, -6 und -7 durch eine direkte Spaltung in den aktiven Zustand überführt werden (Boldin et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996). Zum anderen gibt es einen indirekten Weg über die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran durch die Caspase-8 induzierte Spaltung von Bid (Luo et al., 1998). Dies führt über Apaf1 zu einer weiteren Caspasenspaltung (Abb. 1.1). Die Entscheidung, welcher Weg bevorzugt eingeschlagen wird, ist abhängig vom Gewebetyp, dem Caspase-8 Niveau und den nachfolgenden Caspasen (Scaffidi et al., 1998).

Die Inhibition der Caspase-8 würde eine effektive Hemmung der Apoptose über die Todesrezeptoren CD95-System und LARD und über die TRAIL- und TNF-

Systeme bedeuten. Als Konsequenz würde die Inhibition von Caspase-8 zu einer Hemmung der Zytostatika-induzierten Apoptose beitragen.

Es war möglich, die Expression von Caspase-8 in einer Vielzahl von Zelllinien nachzuweisen: Monozyten, B- und T-Lymphozyten, Kolon, Leber, Magen, Brust, Zervix, Niere, Muskulatur, Lunge und Gehirn (Scaffidi et al., 1997). Außerdem gelang bislang der Nachweis von Caspase-8 in folgenden Tumorzelllinien: malignes Melanom, Bronchialkarzinom und kolorektales Adenokarzinom (Hu et al., 1997).

Bisher sind keine Untersuchungen zur Caspase-8 in Nierenkarzinomen durchgeführt worden, so dass diese Arbeit einen ersten Überblick über die Expression von Caspase-8 in Nierenkarzinomzelllinien bietet.

1.6.2 Caspase-9 und ihre Spleißform Caspase-9s

Die Caspase-9 ist, ebenso wie die Caspase-8 eine Initiatorcaspase (Hadano et al., 1999).

Es sind zwei Aktivierungswege der Caspase-9 bekannt. Der erste Weg führt über die Todesrezeptor-vermittelte Caspase-8-Spaltung, z. B. durch CD95, TNF- α oder TRAIL (Seol et al., 1999) (Abb. 1.10.). Nach der Bindung von Adaptermolekülen (FADD und/oder TRADD) an den aktiven Rezeptorkomplex interagiert die Procaspase-8 mit FADD und wird hierdurch aktiviert (Medema et al., 1997). Die aktive Caspase-8 stimuliert die Translokation von Bid an die Mitochondrien mit nachfolgender Cytochrom C-Ausschüttung. Es folgt eine Aktivierung des „Apoptose-Protease-aktivierenden-Faktors“ (apoptosis proteases activating factor, Apaf-1), der seinerseits die Caspase-9 nach deren Bindung proteolytisch spaltet. Die Caspase-9 aktiviert nun die Caspase-3, die über die PARP-Spaltung [Poly(ADP-ribose) Polymerase] den apoptotischen Zelltod induziert (Duan et al., 1996) (Abb. 1.10.).

Der Alternativweg führt durch chemische oder physikalische Noxen zur Cytochrom C-Ausschüttung aus den Mitochondrien. Allerdings ist der genaue Aktivierungsmechanismus noch nicht entschlüsselt (Ochs et al., 2000). Über Apaf-1 wird dann die Caspasen-Kaskade wie oben beschrieben eingeleitet (Hadano et al., 1999) (Abb. 1.10.).

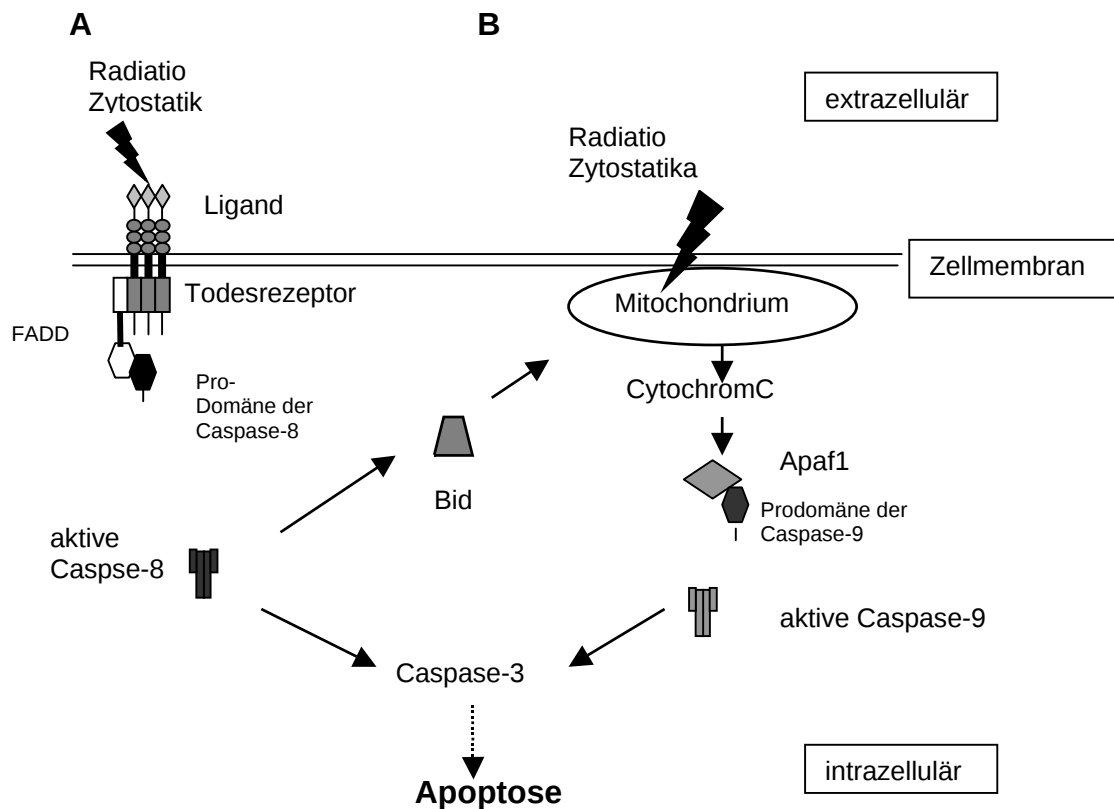


Abb. 1.10.: Schematische Darstellung des rezeptorabhängigen (A) und rezeptorunabhängigen (B) Aktivierungsmechanismus von Caspase-9.

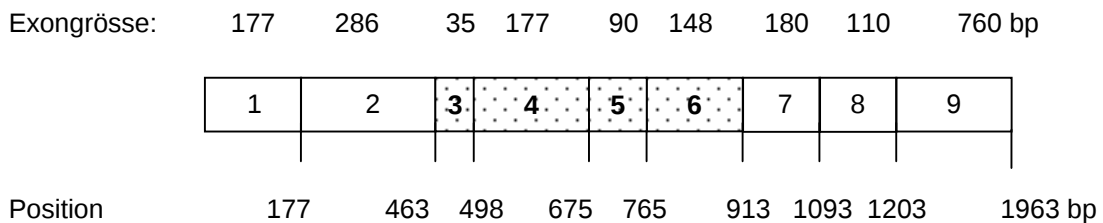
Da die Caspase-9 ihre Wirkung an einem zentralen Punkt der Apoptosekaskade ausübt, kann hier eine effektive Inhibition bewirkt werden. Alle Apoptosewege, die über FADD, TNF- α , TRAIL und Apaf-1 führen, können blockiert werden (Seol et al., 1999). Die Inhibition der Apoptose durch eine Caspase-9-Inaktivierung hat demnach eine große Tragweite für das Tumorwachstum (Seol et al., 1999).

Die Caspase-9 ist auf Chromosom 1p36.1-p36.3 lokalisiert und besteht aus einer 35 kb großen genomischen DNA (Hadano et al., 1999), wobei die 1252 bp große mRNA ein ca. 45,8 kD großes Protein (416 Aminosäuren) kodiert (Duan et al., 1996). Das Caspase-9 Gen besteht aus acht Introns und neun Exons (Hadano et al., 1999) (Abb. 1.11.).

Darüber hinaus kann durch alternatives Spleißen ein 266 Aminosäuren großes Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 27 kD entstehen, das durch eine 801 bp große mRNA codiert wird. Diesem Spleißprodukt fehlt die proteolytisch aktive Domäne mit einem Hauptanteil der großen Untereinheit p17

und wurde von der Arbeitsgruppe von Srinivasula 1999 als "Caspase-9-short" bezeichnet, welches funktionell eine dominant negative Isoform darstellt (Abb. 1.11.). Caspase-9s besteht laut Ergebnissen von Seol et al. (1999) aus den Exonen 1, 2, 7, 8 und 9. Die Exone 3-6, die das katalytische Zentrum enthalten, fehlen dagegen (Abb. 1.11.). Somit hat die Caspase-9s zwar die Möglichkeit an Apaf1 zu binden, und sogar ein Dimer auszubilden, das jedoch die folgenden Caspasen nicht spalten kann. Vielmehr kann es sowohl Apaf, als auch ein intaktes Caspase-9 Molekül durch Ausbildung eines Heterodimers blockieren.

Caspase-9



Caspase-9s

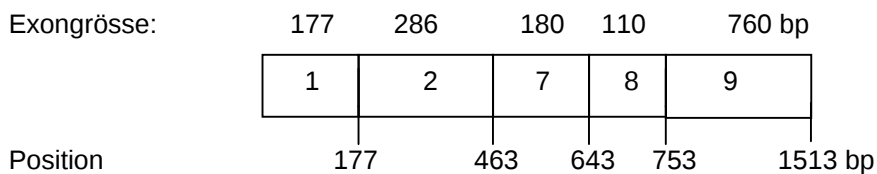


Abb. 1.11.: Schematische Darstellung der Caspase-9 und der löslichen Spleißform Caspase-9s (nach Hadano et al, 1999)
Caspase-9s fehlen die Exone 3-6 mit dem katalytischen Zentrum. Die kodierende Sequenz umspannt die Basenpaare 46-1294 (nach Duan et al., 1996)

Pan konnten 1998 zeigen, dass der artifizielle Austausch von Cystein an Position 287 gegen Alanin (Caspase-9 C287A) ebenfalls zum Verlust der proteolytischen Aktivität von Caspase-9 führt. Der Cysteinrest 287 gehört zu einer hochkonservierten katalytischen Region bestehend aus dem Pentapeptid QACGG (Duan et. al., 1996).

Eine Expression von Caspase-9 konnte bislang in nicht neoplastischem Gewebe von Milz, Thymus, Prostata, Ovarien, Dünndarm, Kolon und in

peripheren Blutlymphozyten von Erwachsenen nachgewiesen werden, ebenso wie im Gehirn, in der Lunge, der Leber und der Nieren von menschlichen Feten. Die Northern-Blot-Analysen dieser Gewebe mit Poly(A)⁺-RNA zeigten zwei Transkripte von 2,3 und 3,0 Kilobasen Größe. Diese repräsentieren einmal die Caspase-9 (3 kb) und möglicherweise die Caspase-9s (2,3 kb) (Duan et al., 1996).

Mittels RT-PCR und Southern-Blot-Untersuchungen wurden die Caspase-9 und Caspase-9s unter anderem in folgenden Tumorzelllinien detektiert: MCF-7 (Mamma-Ca), HepG2 (Hepatozelluläres-Ca), und Hela (Zervix-Ca). Mit Ausnahme von Hela war die Caspase-9 in allen Zelllinien stärker exprimiert als die Caspase-9s (Seol et al., 1999).

Da bisher keine Untersuchungen bezüglich des Expressionsstatus von Caspase-9 und Caspase-9s im Nierenzellkarzinom vorliegen, soll die vorliegende Arbeit einen Überblick über das Expressionsmuster für einige Nierenkarzinomzelllinien geben. Von Interesse ist hierbei insbesondere das Verhältnis der beiden Spleißformen zueinander.

1.7 Regulation der Apoptose durch das Flice-inhibierende Protein FLIP

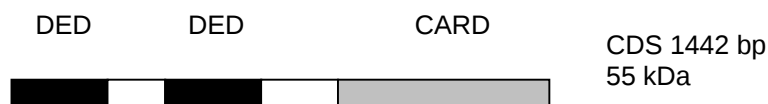
Die Inhibition von Apoptosen ist nicht nur bei der Tumorentstehung ein entscheidender Mechanismus, sondern wird auch von Viren (z.B. Herpesviren, EBV) eingesetzt, um den Untergang der infizierten Wirtszelle zu verhindern. Auf diese Weise sichern sie ihr eigenes Überleben (Thome et al., 1997).

Im Jahr 1997 wurde von mehreren Arbeitsgruppen ein virales Protein gefunden (v-FLIP= virales **F**lice **I**nhibiting **P**rotein), das die Apoptose inhibiert. Wenig später wurde das humane Äquivalent entdeckt (Irmeler et al., 1997; Hu et al., 1997). Da es von verschiedenen Arbeitsgruppen gleichzeitig identifiziert wurde, trägt es viele Synonyme: **FLIP**, Casper, I-FLICE, FLAME-1, CASH, CLARP, MRIT, Ursupin. FLIP ist auf Chromosom 2q33 lokalisiert. Während auf RNA-Ebene vier Spleißformen transkribiert werden, (Srinivasula et al., 1997) sind auf Proteinebene nur die Varianten FLIP_S und FLIP_L translatiert (Irmeler et al., 1997).

FLIP_L besteht aus zwei Todeseffektordomäne, die mit FADD schwach interagieren, und aus einer CARD-Domäne (**C**aspase **R**ecruitment **D**omain), die Caspase 8 bindet (Abb. 1.12.).

FLIP_S hat bis zur Aminosäure 131 eine identische Sequenz mit FLIP_L, jedoch fehlt FLIP_S die CARD-Domäne und zeigt stattdessen einen größeren DED-Bereich (Abb. 1.12).

FLIP_L



FLIP_S



Abb. 1.12.: Schematische Darstellung der beiden Apoptoseinhibitoren FLIP_L und FLIP_S
DED= Todeseffektordomäne, CDS= kodierende Sequenz, kDa= Kilodalton., CARD=
Caspase Recruitment Domain

FLIP_L hat aufgrund seiner Todeseffektordomänen einerseits die Möglichkeit mit FADD und TRADD zu interagieren, andererseits kann es sich mit seiner CARD-Domäne an die Procaspase-8 anlagern. Im Gegensatz dazu besitzt FLIP_S nur die Todeseffektordomänen, so dass die inhibierende Wirkung auf die Blockierung von FADD und TRADD beschränkt ist. Durch die Interaktion von FADD mit FLIP_{L/S} ist das Adaptermolekül blockiert und steht nicht für die Aktivierung von Caspase-8 zur Verfügung (Abb. 1.13.). Außerdem kann FLIP_L ein inaktives Heterodimer mit Caspase-8 bilden. FLIP_L selbst hat keine proteolytische Eigenschaft und kann die Caspase nicht in den aktiven Zustand überführen (Irmeler et al., 1997). Über diese Mechanismen können FLIP_L und FLIP_S die Apoptose wirkungsvoll blockieren.

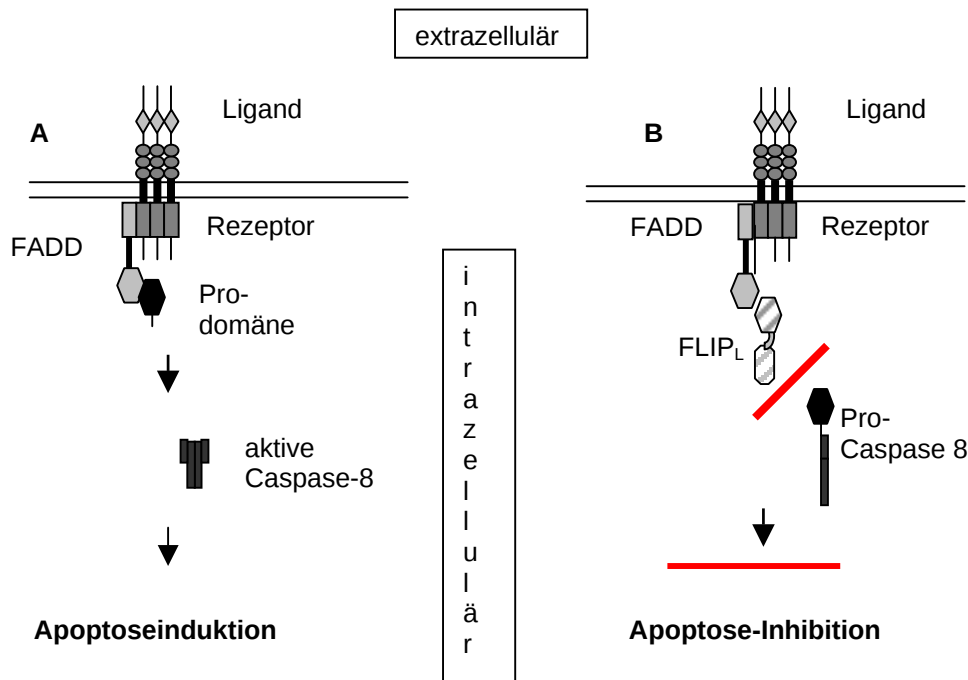


Abb. 1.13: Inhibition der Apoptose FLIP

Scaffidi stellte fest, dass FLIP_{L/S} erst nach Rezeptoraktivierung die inhibierende Wirkung entfalten können und führten das auf die Bildung des DISC zurück (Scaffidi et al., 1999).

Untersuchungen an transfizierten fetalen Nierenzelllinien zeigen, dass FLIP_L eine höhere antiapoptotische Potenz bei der CD95-induzierten Apoptose besitzt, als FLIP_S, während FLIP_S stärker inhibierend bei der TRAIL-induzierten Apoptose wirkt. Möglicherweise ist die Bindungsaffinität zwischen TRADD und FLIP_S stärker als zwischen FADD und FLIP_S (Irmeler et al., 1997).

Die Apoptose kann durch FLIP_{S/L} also an einem zentralen Punkt unterbrochen werden, da nicht nur CD95, sondern auch TRAIL/DR 4/5 und Apo-3-L/LARD die Apoptose über FADD/TRADD und Caspase-8 weiterleiten (Kataoka 1998).

FLIP_L und FLIP_S werden in vielen Geweben exprimiert, wie beispielsweise in Milz, Thymus, Hoden, Herz, peripheren Blutlymphozyten und Skelettmuskulatur. Im Vergleich ist das Expressionsniveau bei gesunden Nieren im Northern-Blot relativ schwache (Srinivasula et al., 1999).

Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von FLIP bei verschiedene Leukämieformen, dem Lungenkarzinom A549, dem kolorektalen Karzinom SW480 und dem maligne Melanom G361 detektiert (Srinivasula et al., 1999).

Für Nierenkarzinome gibt es bislang keine Daten über den Expressionsstatus von FLIP_L und FLIP_S, so dass in dieser Arbeit erstmals eine Charakterisierung der Expression dieser beiden antiapoptotischen Faktoren am humanen Nierenzellkarzinoms erfolgt.

Diese Arbeit dient einer Grundcharakterisierung des therapierefraktären Nierenzellkarzinoms bezüglich der oben erwähnten Inhibitionsfaktoren der Apoptose: sCD95 sowie Spleißformen von LARD, OPG, FLIP und Caspase-9s. Der Vergleich mit Daten aus funktionellen Studien soll darüber hinaus eine Einschätzung der tatsächlichen Bedeutung des jeweiligen Apoptose-Modulators möglich machen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmedien

DMEM (# 41988-029) + Zusätze	10% 2 mM 200 mg/l 72 mg/l 0,01 M 100 ml 100 µg/ml	FCS Glutamin Arginin Asparagin HEPES Penicillin Streptomycin
EDTA-Lösung	0,05%	EDTA pH 8.0 ad PBS
Einfriermedium	20% 10%	FCS DMSO ad DMEM
PBS (pH7,3)	8,0 g/l 0,2 g/l 0,25 g/l 1,35 g/l	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
Trypanblau-Gebrauchslösung	0,2%	Trypanblau ad PBS
Trypsin/EDTA-Lösung	0,25% 0,05%	Trypsin EDTA ad PBS

Alle Materialien wurden von den Firmen Seromed Biochrom KG (Berlin), Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden aus primären Nierenzellkarzinomen etabliert und dienen als Grundlage der Untersuchungen (Tabelle 2.1) (Gerharz et al., 1994, 1995, 1996). Nach histopathologischen Gesichtspunkten handelt es sich dabei um klarzellige (ClearCa), chromophile (Chromphi) und chromophobe (Chrompho) Nierenzellkarzinome (Thoenes et al., 1986; Störkel et al., 1999).

ClearCa-	Stadium	Differenzierungsgrad
1	pT3a	G2
2	pT3a	G3
3	pT3a	G2
4	pT2	G1
5	pT3b	G3
6	pT3b	G3
7	pT2	G3
8	pT3b	G2
9	pT2	G1
10	pT3b	G2
11	pT2	G2
12	PT3	G2
13	pT2	G2
14	pT3b	G3
15	pT3a	G2
16	pT3a	G2
17	pT3a	G3
18	pT2	G2
19	pT2	G2
20	pT3a	G3
21	pT3a	G2
22	pT2	G2
23	pT2	G1
24	pT3a	G2
25	pT2	G2
26	pT2	G1

Chromphi	Stadium	Differenzierungsgrad
1	pT3b	G3
2	pT3a	G2
3	pT2	G2
4	pT2	G1

Chrompho	Stadium	Differenzierungsgrad
A	pT3a	G2

Kurzzeitkulturen nicht neoplastischer Tubulusepithelien
NNT-1
NNT-2

Tabelle 2.1: Zusammenstellung aller untersuchter Nierenkarzinomzelllinien mit Tumortyp, Tumorstadium und Differenzierungsgrad und der Kurzzeitkulturen nicht neoplastischer Tubulusepithelien

2.3 Chemikalien

Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ammoniumacetat (4M)	E. Merck, Darmstadt
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA (Bovines Serumalbumin)	E. Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Chloroform	E. Merck, Darmstadt
Concavalin A	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
D-Glukose	E. Merck, Darmstadt
Dinatrium-Hydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
EDTA (pH 8,0; 0,5M)	C. Roth, Karlsruhe
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Formamid	E. Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycerol (50%)	E. Merck, Darmstadt
Glycin	E. Merck, Darmstadt
Interleukin-2	Boehringer, Mannheim
Isoamylalkohol	E. Merck, Darmstadt
Isopropanol	E. Merck, Darmstadt
Kaliumacetat (1M)	E. Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat (100mM)	E. Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)-Hexahydrat (100mM)	E. Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (1M)	E. Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	E. Merck, Darmstadt
Natriumacetat (pH 5,2; 3M)	E. Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (5M)	E. Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (1M)	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	E. Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	E. Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	C. Roth, Karlsruhe
Sulfosalizylsäure	C. Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	E. Merck, Darmstadt
Yeast Extract	Serva, Heidelberg

2.4 Lösungen und Puffer

Ammoniumpersulfat (APS)	10%	
Ampicillin	100 mg/ml	
Bradford-Arbeitslösung	3% 6% 7%	Ethanol abs. Phosphorsäure Serva Blue G
Cäsiumchlorid	5,7 M	in 0,1M EDTA pH 8
Denhardts Lösung (50x)	1% 1% 1%	Ficoll Polyvenylpyrrolidon BSA
DEPC-H ₂ O	0,1%	Diethylpyrocarbonat ad H ₂ O
DNA-Ladepuffer (6x)	125 mM 2% 0,02% 10%	Tris pH 6,8 SDS Bromphenolblau Glycerol
dNTP Mix	10 mM 10 mM 10 mM 10 mM	dATP (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) dCTP dGTP dTTP
Ethidiumbromid-Färbepuffer	0,0003%	Ethidiumbromid ad H ₂ O
GIT-Lysepuffer pH 5,5	4 M 20 mM 0,5% 0,1 mM 1%	Guanidinisothiocyanat (GIT) Natriumacetat N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl) Dithiotreitol (DTT) β-Mercaptoethanol
Lämmli-Ladepuffer (2x)	125 mM 2% 10% 10% 0,02%	TRIS pH 6,8 SDS Glycerol β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Luria-Bertani-Medium (LB) pH 7,5	10 g/l 5 g/l 10 g/l 1 mM	Bactotrypton Bactoyeast Extrakt NaCl NaOH
LB-Agarplatten	10 g/l 5 g/l 10 g/l 1 mM 16 g/l 100 µg/ml	Bactotrypton Bactoyeast Extrakt NaCl NaOH Agar Ampicillin

Methylenblau	0,5 M 0,04%	Natriumacetat pH 5,2 Methylenblau
MOPS Laufpuffer (5x)	0,1 M 40 mM 5 mM	MOPS Natriumacetat EDTA pH 8,0
PAGE-Gellaufpuffer	25 mM 250 mM 0,1%	TRIS Base Glycin SDS
PBS pH 7,3	8,0 g/l 0,2 g/l 0,25 g/l 1,35 g/l	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
Panceau-S-Lösung	5%	Panceau-S-Konzentrat in 5% Essigsäure
Protein-Lysepuffer	0,1 M 0,01 M 0,001 M 1%	Natriumchlorid TRIS-HCl pH 7,6 EDTA pH 8,0 Nonidet P40
SSC (20x) pH 7,0	3 M 0,3 M	Natriumchlorid Natriumcitrat
SDS	10%,	pH 7,2
SDS-Probenpuffer (2x)	100 mM 200 mM 4% 0,2% 20%	TRIS-Cl pH 6,8 Dithiotreitol SDS Bromphenolblau Glycerol
TBE (5x)	0,45 M 0,01 M	TRIS-Borat EDTA
TE	10 mM 1 mM	TRIS-HCl pH 7,6 EDTA pH 8,0
TE-Puffer pH 7,6	10 mM 1 mM	TRIS-HCl pH 7,6 EDTA pH 8,0
TRIS-HCl pH 6,8	1M	
TRIS-HCl pH 7,6	1M	
TRIS-HCl pH 8,3	1M	
TRIS-HCl pH8,8	1,5 M	
X-Gal-Färbelösung	5 mM 5 mM 2 mM 2,5 mM	Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat Kaliumhexacyanoferrat(III)-Hexahydrat Magnesiumchlorid X-Gal
X-Gal-Stammlösung für Färbelösung	40 mM	in Dimethylsulfoxid
X-Gal-Stammlösung für Agarplatten (1000x)	20 ng/ml	in N,N-Dimethylformamid

SDS-Polyacrylamidgel:

12% Trenngel	40% 25% 1% 1% 0,04%	Acrylamid Mix (30%) (C. ROTH) TRIS pH 8,8; 1,5 M SDS (10%) Ammoniumpersulfat (10%) TEMED ad H ₂ O
5% Sammelgel	17% 12,5% 1% 1% 0,1%	Acrylamid Mix (30%) (C. ROTH) TRIS pH 6,8; 1,0 M SDS (10%) Ammoniumpersulfat (10%) TEMED ad H ₂ O

Western-Blot:

Blockierlösung	4% 2%	Milchpulver BSA ad PBS
Elektrophoresepuffer (1x)	3,5 mM 25 mM 192 mM	SDS TRIS Glycin
Transferpuffer	25mM 192 mM 20%	TRIS Glycin Mehanol
Waschpuffer	10 mM 150 mM 0,2%	TRISpH 7,5 Natriumchlorid Tween 20%

2.5 Antikörper

FAS (C-20), polyclonal, Kaninchen	sc 715 Santa Cruz Biotechnologie
Caspase-8 p20 (C-20), polyclonal, Ziege	sc 6136 Santa Cruz Biotechnologie
Anti- α -Tubulin, monoclonal, Maus	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

2.6 Kits

RT-PCR Kit	Stratagen, La Jolla, Kalifornien, USA
Jetsorb DNA Extraktion aus Agarosegel	Genomed, Bad Oeynhausen
RNeasy Blood Mini Kit	Quiagen, Hilden
Rneasy Midi Kit	Quiagen, Hilden
sFas (S) Elisa Kit	Coulter Immunotec Diagnostic, Hamburg
Rediprime DNA labelling System	Amersham Life Science Buckinghamshire, UK
Dye DesoxyTerminator Cycle Sequencing Kit	PE Biosystems, Weiterstadt
Plasmid Mini Kit	Quiagen, Hilden
100bp DNA-Leiter	GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
Low Range Proteinmarker	BIO-RAD Laboratories, USA
Hybond-Nylonmembran	Amersham Life Science Buckinghamshire, UK
ECL Western blotting Reagents	Amersham Life Science Buckinghamshire, UK
Hyperfilm ECL Chilumineszenzfilme	Amersham Life Science Buckinghamshire, UK

2.7 Geräte

J2 MC-Zentrifuge (JA 10 Rotor)	Beckmann Instruments, München
L8 70M-Ultrazentrifuge (SW41 Ti Rotor)	Beckmann Instruments, München
Megafuge 1.0R (3360 Rotor)	Heraeus, Hanau
Biofuge 13 R (3042 Rotor)	Heraeus, Hanau
Spectrophotometer DU640	Beckmann Instruments, München
Digitales Bildverarbeitungssystem	Fröbel Labortechnik, Deutschland

ELISA-Reader	Titertek Multiskan, Huntsville
GenAmp PCR System 2400	PE Biosystems, Weiterstadt
T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen
ABI PRISM 310 Sequenziersystem	PE Biosystems, Weiterstadt

2.8 Kultivierung der Nierenzellkarzinome

Die von uns permanent verwendeten Zelllinien wurden aus primären humanen Nierenzellkarzinomen etabliert (Gerharz et al., 1994, 1995, 1996). Die Zelllinien wurden in Nunclon™-Kulturflaschen mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) nach dem Standardprotokoll nach Doyle (1991) kultiviert und das Zellwachstum regelmäßig überprüft.

Zum Auftauen der stickstoffgefrorenen Tumorpräparate wurden diese in 30cm² Kulturflaschen mit 5ml Nährmedium für 3-4 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.8.1 Herstellung von Zellkulturüberständen

Kulturen, die zu ca. 2/3 konfluent bewachsen waren, wurden 2 mal mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden 3 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und nach 72 Stunden der Überstand in ein 15ml-Falcon™-Röhrchen dekantiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1100 U/min wurden die oberen 2 ml als Aliquods zu je 500 µl abgenommen und in Nunc™Röhrchen bei –80°C eingefroren.

2.9 Isolierung von Gesamt-RNA

2.9.1 Gesamt-RNA Isolierung mittels RNeasy Kit

Je nach eingesetzter Zellmenge kam entweder das RNeasy mini Kit (bis 5x10⁶ Zellen) oder das RNeasy midi Kit (5x10⁶ bis 1x10⁸ Zellen) zur Anwendung. Die Zellpellets wurden langsam im Eisbad aufgetaut und die RNA nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers isoliert.

Prinzipiell wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Lyse der Zellen
- Bindung der RNA an einem feinen Netz durch Zentrifugation
- Dreimaliges Waschen der RNA mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration
- Lösen der RNA vom Netz mit RNase freiem Wasser

2.9.2 Gesamt-RNA Isolierung mit der Ultrazentrifuge

Die Zellpellets wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 5ml GIT durch ausgiebiges Mischen lysiert.

Die weitere Isolierung erfolgte nach dem Standardprotokoll von Sambrook (1999).

2.9.3 Präzipitation von RNA

Die RNA-Lösung wurde mit 4 Volumen absolutem Ethanol und 0,1 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 gemischt und für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 14000U/min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 20 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und die RNA mit 300 μl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA wurde mit 60 μl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

2.9.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Sowohl die Menge der Nukleinsäuren, als auch deren Reinheit konnten mit dem Spektrophotometer (Beckmann DU-630) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden.

Die Konzentration ließ sich mit folgender Formel ermitteln:

$$\text{OD (260)} \times \text{Verdünnung} \times E = [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

E= spezifischer Extinktionskoeffizient der entsprechenden Nukleinsäure:

- RNA: 0,04
- DNA: 0,05

2.10 Reverse Transkription (RT)

Um aus der extrahierten mRNA die für die PCR notwendige cDNA herzustellen, wurde eine reverse Transkription mittels einer reversen Transkriptase durchgeführt. Mit Hilfe eines spezifischen Startermoleküls (Primer) konnte die reverse Transkriptase die komplementäre DNA (cDNA) synthetisieren.

Das Enzym stammt entweder von Affen-Myeloblastosis-Viren (AMV-RTase) oder von Moloney-Maus-Leukämie-Viren (MMLV-RTase). Die AMV-RTase hat den Vorteil, dass sie auch bei Temperaturen bis 50°C nicht inaktiviert wird.

2.10.1 Reverse Transkription mit MMLV-RTase

Alle Substanzen stammten aus dem RT-PCR-Kit von Statagen. Die reverse Transkription mit MMLV-RTase erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers: Eine gewünschte Menge RNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser zu einem Volumen von 38 µl aufgefüllt. Hinzu kamen 3 µl Oligo-dT-Primer (300ng/µl). Nach einer Annealingzeit von 5 Minuten bei 65 °C wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und die folgenden Substanzen zugefügt.

5 µl	first-strand buffer (10-fach)
1 µl	RNase Block (40 U/µl)
1 µl	MMLV-RT (50 U/µl)
2 µl	dNTPs (25 mM each)

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für eine Stunde und endete mit einer Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten.

Die RT wurde auf einem Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt.

Die extrahierte cDNA wurde bei –20°C gelagert.

2.10.2 Reverse Transkription mit AMV-RTase

Eine gewünschte Menge RNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser zu einem Volumen von 19 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde

6 µl	5x RT-Puffer (Promega)
1 µl	dNTPs (10mM each, Sigma)
3 µl	Oligo-dT-Primer (300 ng/µl, Stratagen)
0,5 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl, Promega)
0,5 µl	AMV-RTase (10 U/µl, Promega)

hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 50°C für eine Stunde mit einer abschließenden Denaturierung bei 75°C für 10 Minuten.

Die Reaktion wurde auf einem UNO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt und die cDNA bei –20°C gelagert.

2.11 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde entwickelt, um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen, ohne dabei auf die Klonierung zurückgreifen zu müssen. Durch ein spezifisches Startermolekül (Primer), das an einzelsträngige DNA bindet, kann sich eine Polymerase an die Matrize anlagern und diese kopieren. Wird dieser Vorgang mehrfach wiederholt, resultiert eine exponentielle Vervielfältigung, da jede neu synthetisierte DNA wieder als Vorlage dient. Nach 25 Zyklen sind bis zu 10^5 neue DNA-Moleküle pro Startermolekül entstanden (Newton and Graham, „PCR“, Spektrum-Verlag). Die PCR setzt sich aus drei temperaturabhängigen Schritten zusammen, die 25-35 mal wiederholt werden:

die Denaturierung der DNA zur Herstellung von Einzelsträngen	(92-95°C)
das Anlagern (Annealing) der Primer an die Matrize	(55-65°C)
die Kettenverlängerung durch die Polymerase	(72°C)

Am Anfang steht eine einmalige Denaturierung bei 95-100°C für 2 -5 Minuten. Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine zusätzliche Kettenverlängerung von 5-7 Minuten, um alle Stränge vollständig zu synthetisieren.

Die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem *Thermus aquaticus* bietet sich besonders an, da sie bei den Denaturierungsschritten nicht inaktiviert wird.

Die Primer sind so gewählt, dass sie das gewünschte DNA-Fragment flankieren. Eines der Startermoleküle ist komplementär zum kodierenden Strang das andere zum nicht kodierenden Strang, so dass die Taq-Polymerase, die eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität besitzt, die Matrize gegenläufig ablesen kann.

In dieser Arbeit wurden 2 bis 5 µl cDNA, 100 µM dNTPs each, 1 µM Primer (50 pmol/µl), 2,5 U Taq-Polymerase und 5 µl 5x Puffer in einen 50 µl Ansatz pipettiert.

Folgende Zyklen wurden durchlaufen:

initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	1min
Anlagerung	*	1min
Kettenverlängerung	72°C	1min
Reaktionsabbruch	72°C	5min


35x

* Die Temperatur bei der Anlagerung richtete sich nach dem Schmelzpunkt der jeweiligen Primer (siehe Tabelle 2.2.)

Abweichungen von diesem Protokoll werden jeweils angegeben.

Folgende Primer und Annealingtemperaturen kamen zur Anwendung:

Name	Primersequenz	Annealing-temperatur
CD95-R (Cascino, 1995)	Sense: 5'>CAG AAC TTG GAA GGC CTG CAT C<3' Anti-sense: 5'>ATT TAT TGC CAC TGT TTC AGG<3'	55°C
CD95-L	Sense: 5'> ATA GGA TCC ATG TTT CTG CTC TTC CAC CTA CAG AAG GA<3' Anti-sense: 5'>ATA GAA TTC TGA CCA AGA GAG AGC TCA GAT ACG TTG AC<3	55°C
LARD	Sense: 5'>GTC TGT TTT GTT GCA GAG GC<3' Anti-sense: 5'>GTG GCG GTA TGT GTA GGT CA<3	60°C
OPG	Sense: 5'>CAA GCA GGA GTG CAA TCG CA<3' Anti-sense: 5'>AAG AAT GCC TCC TCA CAC<3' (Vidal et al., 1998)	64°C
Caspase 9	Sense: 5'>ATG GAC GAA GCG GAT CGG<3' Anti-sense: 5'>CCC TGG CCT TAT GAT GTT <3'	57°C
FLIP _L	Sense: 5'>GGA CCT TGT GGT TGA GTT GG<3' Anti-sense: 5'>CTG TCG TAG TCT CGG TGC TC<3'	58°C
FLIP _S	Sense: 5'>GGA CCT TGT GGT TGA GTT GG<3' Anti-sense: 5'>ATC AGG ACA ATG GGC ATA GG<3'	60°C
GAPDH	Sense: 5'>ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G<3' Anti-sense: 5'>CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG<3'	55°C

Tabelle 2.2: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Primer und der jeweiligen Annealingtemperaturen.

2.12 Auftrennung von Nukleinsäuren mit der Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikation wurde eine Gelelektrophorese angefertigt. Hierfür wurden je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente 1-2%ige Agarosegele mit 1x TBE verwendet:

Die Gele wurden im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml in 1xTBE) für 15 Minuten gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und macht sie auf diese Weise durch Fluoreszenz von UV-Licht sichtbar. Mit einem digitalen Bildverarbeitungssystem (Fröbel Datentechnik, Deutschland) konnte das Gel fotografiert, und das entsprechende Bild ausgedruckt oder weiterverarbeitet werden (Thermodrucker, P68E, Mitsubishi, Japan).

2.13 Reinigung von DNA durch Gelelution

Die Gelelution erfolgte mit dem JETSORB-Gelelutionskit der Firma Genomed.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde 1:5 mit Ladungspuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde das Gel kurz mit Ethidiumbromid gefärbt (Kapitel 2.12.), die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein zuvor gewogenes 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Durch erneutes Wiegen konnte das Gewicht der herausgeschnittenen Gelstücks ermittelt werden. Die Menge der benötigten Puffer und Substrate richtete sich nach dem Gewicht des Gelstücks. Für 100mg Gel benötigt man 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETSORB-Suspension. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 50 °C erfolgt eine Zentrifugation bei > 10000 g für 30 Sekunden. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das DNA-haltige Pellet wurde nun schrittweise mit Puffer A1 und Puffer A2 gewaschen und durch Zentrifugation von den Waschpuffern getrennt. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, erfolgte eine Resuspension mit 20 µl TE-Puffer und eine Inkubation bei 50 °C für 5 Minuten. Hierdurch löste sich die DNA und konnte nach erneuter Zentrifugation mit dem Überstand in ein frisches Gefäß überführt werden. Dieses Vorgehen folgte genau dem beiliegende Protokoll der Firma Genomed.

2.14 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruch-Methode, die von Sanger (Sanger et al.,1977) entwickelt wurde.

Dabei dient die cDNA aus der PCR oder die Plasmid-DNA, in die die zu untersuchende Nukleinsäure-Sequenz inkloniert wird, als Template. Fluoreszenzmarkierte dNTPs werden durch eine Polymerase eingebaut. Es wird ein spezifischer Primer des kodierenden oder des nichtkodierenden Stranges als Startmolekül für das Enzym eingesetzt. Der Einbau eines markierten Nukleotids blockiert die weitere Kettenverlängerung, und es kommt zum Abbruch der Reaktion. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange Ketten mit einem spezifischen markierten Nukleotid am Ende. Die Farbkodierung kann später von einem Sequenzierer erkannt und analysiert werden.

2.14.1 Sequenzierung eines PCR-Produktes

Nach der Gelelution des PCR-Produktes mit JETSORB (Kapitel 2.13.) wurden 10 µl des Eluats in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

10 µl	cDNA
4 µl	RR DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit
1 µl	5' oder 3' Primer (10 pmol/µl)
5 µl	HPLC-Wasser
20 µl	Gesamtvolumen

Programm:

96°C	30 sec	25 x
50°C	15 sec	
60°C	4 min	

Die verwendeten Primer entsprachen jeweils denjenigen der PCR-Amplifikation.

In dem Terminator Cycle Sequenz Kit waren die bereits erwähnten fluoreszenzmarkierten dNTPs enthalten, sowie Ampli-Taq-Polymerase, nicht-markierte dNTPs und Puffer.

Für die folgende Fällung wurden zu dem gesamten Ansatz 80 µl DEPC-Wasser, 10 µl Natriumacetat 3 M, pH5,2 und 250 µl abs. Ethanol hinzugegeben und bei 14000 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Die DNA wurde so von überschüssigen ddNTPs befreit, die die maschinelle Auswertung stören würden.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet an der Luft für 5 bis 10 Minuten getrocknet.

Danach wurde das Pellet mit 15 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) aufgenommen, gemischt, für 5 Minuten bei 95°C de naturiert und danach sofort ins Eisbad gestellt.

Die automatische Auswertung erfolgte mit einem ABM-Prism 310 Sequencer der Firma Perkin Elmer (Überling).

2.14.2 Sequenzierung klonierter DNA

Für die Sequenzierung wurden 2 µg DNA eingesetzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

2 µl	cDNA
4 µl	RR DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit
1 µl	Sp6- oder T7-Primer (10 pmol/µl)
Ad 20 µl HPLC-Wasser	

Programm:

96°C	10 sec	25 x
45°C	5 sec	
60°C	4 min	

Die weiteren Schritte entsprachen denen aus Kapitel 2.14.1.

2.15 Nachweis von löslichem CD95-Rezeptor (sCD95) mittels der Elisa-Technik

Für den quantitativen Nachweis von löslichen CD95-Rezeptors wurde der kommerziell erhältliche sFas-Elisa der Firma Immunotech verwendet, der auf dem Sandwich-Prinzip beruhte.

Eine 96-Well-Platte wurde mit einem polyclonalen Antikörper gegen die Aminosäuren 305 bis 319 der intrazelluläre Domäne des löslichen CD95-Rezeptors beschichten. Die Probe wurden in den Wells inkubiert und anschließend gewaschen. Ein zweiter, monoklonaler Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert war und die Aminosäuren 110 bis 120 des extrazelluläres Epitop des Rezeptors erkannte, wurde hinzugefügt und inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Peroxidase-Substrat

mit dem Chromogen gemischt und auf der Platte inkubiert. Eine Säurelösung, die die Enzymreaktion stoppte, wurde nach einer festgelegten Zeit hinzugegeben, um die Farbreaktion zu stabilisieren. Die optische Dichte konnte zuletzt bei einer Wellenlänge von 450nm in einem Elisa-Reader (Titertek Multiskan) gemessen werden.

Mit Hilfe einer Eichkurve, die aus den mitgeführten Standards erstellt wurde, konnte die sCD95-Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

Als Proben wurden Patientenseren (Kapitel 2.16.) und Überstände der Zellkultur (Kapitel 2.8.1) verwendet.

Zusammengefasst erfolgten folgende Schritte:

- 50 µl Probe + 200 µl Sample-diluent mischen
- davon je 100 µl in die Antikörper-beschichteten Wells geben
- bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter leichtem Schütteln inkubieren
- Proben dekantieren und die Wells 4 mal mit Waschlösung waschen
- Je 100 µl Conjugate-Lösung in jedes Well geben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren
- Die Proben dekantieren und die Wells 4 mal mit Waschlösung waschen
- Je 100 µl Substance-Reagens in jedes Well geben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Schütteln inkubieren
- Je 100 ml Stop-Lösung in jeden Well geben
- Die Absorption konnte nun bei 450 nm in eine ELISA-Reader abgelesen werden.
- Für die Eichkurve wurden acht Standards unterschiedlicher Konzentration mitgeführt.

Die einzelnen Arbeitsschritte folgten genau den Herstellerangaben (Immunotech).

2.16 Herstellung von Serum

Die Patientenseren wurden uns freundlicherweise von der Klinik für Urologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Ackermann) des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Seren von Patienten, mit einem histologisch gesicherten Nierenzellkarzinom. Am Tag

vor der Resektion des Karzinoms und 8 bis 15 Tage nach der Operation wurde venöses Blut entnommen und Serum gewonnen:

Das frisch entnommene Blut wurde zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehengelassen. Der Blutkuchen wurde dann vorsichtig mit einem Kunststoffstab von der Innenwand des Röhrchens gelöst. Es folgt eine Zentrifugation bei 4000 U/min für 5 Minuten. Das Serum, das sich jetzt oberhalb der Trennschicht befand, wurde in ein frisches Röhrchen gegeben und erneut wie oben zentrifugiert. Das partikelfreie Serum konnte bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Einteilung der Nierenzellkarzinome erfolgte nach dem gleichen Schema, wie bereits bei den Zelllinien beschrieben. Das Tumorstadium wurde nach dem TNM-System bestimmt (Tabelle 2.3.).

Patient	Alter (Jahre)	m/w	Typing	Staging	Grading
1	78	m	Clear-Ca	pT1,pNx,pMx	G2
2	59	m	Clear-Ca	PT1,pNx,pM0	G2
3	54	m	Clear-Ca	pT2, pN1, pM0	G2
4	61	m	Clear-Ca	pT2, pNx, pMx	G2
5	60	m	Clear-Ca	pT3a, pNx, pM1	G2
6	60	m	Clear-Ca	pT2, pN1, pM1	G3-4
7	64	m	Clear-Ca	pTx, pNx, pM1	G2
8	60	m	Chromphi	pT2, pN0, pMx	G3
9	56	w	Clear-Ca	pT1, pNx, pMx	G1
10	63	w	Clear-Ca	pT3b, pN0, pMx	G2
11	77	w	Clear-Ca	pT1, pNx, pMx	G2

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der Nierenzellkarzinompatienten mit Bezeichnung des Tumortyps und des Tumorstadiums.

Die Kontrollgruppe setzt sich wie folgt zusammen:

Kontrolle	Alter (Jahre)	m/w
Norm 1	23	w
Norm 2	22	m
Norm 3	23	m
Norm 4	35	m

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Kontrollgruppe

2.17 Proteinnachweis mittels Western Blot

2.17.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Sambrook et al. (1989).

Die Zellen wurde von der Kulturflasche gelöst und ein Pellet hergestellt, das je nach Größe mit 100-500 µl Lysepuffer aufgenommen wird.

Nach der vollständigen Lyse der Zellen wurden die festen Bestandteile für 10 Minuten bei 14000 U/min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

2.17.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

In der Bradford-Lösung befindet sich ein quantitativ bindender Farbstoff (Serva blue G, Serva, Heidelberg), der die Lösung blau färbt und das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Für die Proben wurden 5 µl des Lysats mit 45 µl Aqua dest. und 1200 µl Bradford-Gebrauchslösung (Bio-Rad) gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Der Leerwert enthält statt der Probe nur 5 µl Lysepuffer; die Standardproben BSA in unterschiedlichen bekannten Konzentrationen. Durch Messung dieser Proteinmengen konnte eine Standardkurve erstellt, und die Proteinmenge in den Proben danach bestimmt werden.

2.17.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Herstellung des Polyacrylamid-Gels und die Elektrophorese folgten dem Protokoll nach Sambrook (1989). Zur Anwendung kamen Trenngele mit einer Konzentration von 10-12%, je nach der Proteingröße und 5%ige Sammelgele.

Die gewünschte Menge Protein wurde mit der gleichen Menge 2x-Ladungspuffer für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann auf das

vorbereitete Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente ein low-range Marker der Firma Bio-Rad.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel für 1-1,5 Stunden durchgeführt

2.17.4 Western Blot

Der Blotaufbau wurde aus dem Protokoll von Sambrook et al. (1989) übernommen: Schwämmchen

2 Whatman-Papiere

Polyacrylamid-Gel mit Proteinproben

Nitrozellulosemembran

2 Whatman-Papiere

Schwämmchen

Der Proteintransfer erfolgte durch Kapillarkräfte auf eine 45 µm starke Nitrozellulose-Membran (Optitran, Schleicher & Schuell) in einer gekühlten Kammer und nahm eine Stunde bei 100 V in Anspruch.

Die Proteine wurden zur Kontrolle anschließend durch Ponceau-S-Lösung dargestellt und nach der Markierung der Banden des Größenmarkers mit Aqua dest. gewaschen. Über Nacht erfolgt eine Inkubation der Membran bei 4°C in 10 ml Blocking -Puffer.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:1000 auf dem Rolltisch wurde der überschüssige oder unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit Waschpuffer entfernt.

Der sekundäre Antikörper, der mit Peroxidase gekoppelt war, wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:2000 hinzugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde auf dem Rolltisch folgten erneut 3 Waschgänge. Die Illuminiszenzreaktion wurde durch das Lumi-Light Western-Blot-Substrate (Boehringer) ausgelöst. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase wandelte das Lumi-Light-Substrat so um, dass eine Lichtemission resultierte. Die Membran wurde daraufhin für 5 Minuten in den 1:1 gemischten Verstärkungs- und Stabilisationslösungen geschwenkt. Die

Detektion erfolgte mit einem Hyperfilm™ECL™ der Firma Amersham Life Science. Die Expositionszeit hing von der Stärke des Signals ab. Bei starken Signalen, d.h. großen Proteinmengen, genügte oft eine Exposition von 1 bis 5 Minuten. Schwache Signale waren erst nach einigen Stunden zu sehen, wobei die Aktivität der Lösung exponentiell abfiel und nach sechs Stunden keine Verstärkung des Signals mehr zu erwarten war.

2.18 Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor

Die Klonierung erfolgte in dem pGEM-T-Vektor der Firma Promega. Zunächst wurde eine PCR angefertigt, der gesamte Ansatz in einem 1%iges Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit dem JETSORB-Kit die DNA gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer gemessen. Durch die Verwendung von Taq-Polymerase in der PCR endet jedes DNA-Molekül mit einem Poly-A-Schwanz. Der T-Vektor begann mit einer Poly-T-Seite, so dass sich Basenpaarungen zwischen dem Vektor und der DNA ausbilden konnten.

In dieser Arbeit wurden LARD und FLIP zur Überprüfung der RT-PCR-Sequenzen kloniert, da eine direkte Sequenzierung der RT-PCR-Produkte hier aus technischen Gründen nicht vollständig möglich war.

2.18.1 Ligation und Transformation

Die Ligation und Transformation wurden mit dem pGEM-t-Vektor System I von Promega durchgeführt, und folgten genau dem beiliegenden Protokoll des Herstellers.

Es wurden drei Ligationsansätze mit den Verdünnungen 1:1, 1:3, 1:5 angefertigt.

Die Transformation erfolgte in kompetente Zellen bei 37°C für eine Stunde unter leichtem Schütteln. Nach Ablauf dieser Zeit wurden je 300 µl der Transformationsansätze auf Kulturplatten ausgestrichen. Die Kulturplatten enthielten folgende Zusätze:

- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galaktosid = X-Gal
- Isopropylthio-Beta-D-Galaktosidase = IPTG
- Ampicillin

Das X-Gal ist ein Indikator und zeigt an, welcher der Bakterienklone das Plasmid enthält. Der Vektor codiert für das aminoterminalen Fragment der β -Galaktosidase. Die Synthese dieses Fragments kann durch Isopropylthio- β -D-Galaktosidase (IPTG) induziert werden. In Kombination mit X-Gal auf den Kulturplatten entwickelt sich ein blauer Farbstoff. Der Einbau der Fremd-DNA in die kodierende Sequenz der β -Galaktosidase verhindert die Synthese des Enzyms und die Kolonie bleibt weiß.

Das Anwachsen der Kolonien nahm ca. 16 Stunden bei 37°C in Anspruch. Damit sich die Farben richtig entwickelten, war eine nachfolgende zweistündige Inkubation bei 4°C notwendig.

Es wurden insgesamt 10 Kolonien, eine blaue als Kontrolle und 9 weiße von den Platten gepickt und je einer Kolonie in ein Reagenzglas mit 5ml LB-Medium überführt. Darin wurden sie zum weiteren Wachstum im Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.18.2 DNA-Extraktion aus dem Plasmid

Nach ca. 16 Stunden wurden 1,5 ml des Mediums, das nun trüb war, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei 5000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, weitere 1,5 ml Medium auf das Pellet gegeben, die Zentrifugation wiederholt und der Überstand verworfen. Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde das Plasmid-Mini-Kit von Qiagen benutzt, nach dessen Protokoll verfahren wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Basale Apoptoserate und Induzierbarkeit der Apoptose in Nierenzellkarzinomen

Einleitend sollen hier einige Ergebnisse aus funktionellen Studien dargestellt werden, die sich mit der Apoptoseinduktion im Nierenzellkarzinom befassen und im Rahmen anderer Untersuchungen erhoben wurden (Gerharz et al., 1999). Sie dienen als Vergleich und Diskussionsgrundlage für die in der vorliegenden Dissertation gewonnenen Ergebnisse.

Zunächst wurde die basale Apoptoserate (BAD) der Nierenkarzinomzelllinien und die spezifische Apoptoserate (SAD) nach Stimulation der Tumorzellen mit CH11, INF- γ oder CH11 + INF- γ und der AEF (Apoptose-Anreicherungs-Faktor = Apoptosis Enrichment Factor) bestimmt. Die spezifische Apoptoserate ist die Häufigkeit der Apoptose nach Exposition von CH11, INF- γ oder CH11 + INF- γ minus der Häufigkeit der Apoptose in Standard-Zellmedium. Der AEF ist die Apoptosehäufigkeit der Zellen nach Behandlung mit CH11, INF- γ oder CH11 + INF- γ relativ zu der Häufigkeit der Apoptose in Standard-Zellmedium. Diese Resultate sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Kurz zusammengefasst ergaben sich folgende Ergebnisse:

Die basale Apoptoserate (BAD) war bei allen 30 Nierenkarzinomzelllinien niedrig und schwankte zwischen 0,2 und 3,9%.

Gegenüber einer Apoptoseinduktion mit dem Antikörper CH11, welcher spezifisch das CD95-System aktiviert, zeigten sich lediglich neun Zelllinien gemäss SAD und AEF sensitiv: ClearCa-3, ClearCa-6, ClearCa-11, ClearCa-14, ClearCa-17, ClearCa-21, ClearCa-22, CleraCa-23 und ClearCa-25. Die größte Sensitivität wies ClearCa-6 auf mit einer SAD von 32,1%. Alle übrigen untersuchten Zelllinien waren resistent gegenüber CH11 (Tabelle 3.1).

Die Ergebnisse bei der Apoptoseinduktion durch INF- γ zeigten noch geringere Ansprechraten von maximal 3,3% (ClearCa-3) bzw. 3,5% (ClearCa-6).

Tumortyp	BAD (%)	CH11		IFN- γ		IFN- γ + CH 11	
		SAD (%)	AEF	SAD (%)	AEF	SAD (%)	AEF
ClearCa-1	2,2	0	1,0	0	1,0	0	1,0
ClearCa-2	1,2	0	1,0	0	1,0	0,3	1,3
ClearCa-3	2,6	8,3	4,2	3,3	2,3	10,3	5,0
ClearCa-4	1,1	0,9	1,8	0,2	1,2	4,5	5,1
ClearCa-5	0,8	0,5	1,6	0,2	1,3	1,5	2,8
ClearCa-6	2,1	32,1	16,2	3,5	2,7	48,9	24,3
ClearCa-7	1,3	2,1	2,6	0,3	1,2	4,8	4,6
ClearCa-8	3,9	0,8	1,2	0	1,0	31,2	9,0
ClearCa-9	3,7	0,8	1,2	0,7	1,2	10,6	3,9
ClearCa-10	0,4	0,5	1,8	0,9	3,3	1,2	4,0
ClearCa-11	0,2	2,8	15,0	0,3	2,5	3,7	19,5
ClearCa-12	0,6	0,9	2,5	0,3	1,5	6,2	11,3
ClearCa-13	1,1	0	1,0	0	1,0	0,8	1,7
ClearCa-14	0,5	1,6	4,0	0	1,0	24,3	50
ClearCa-15	0,2	0,1	1,5	0	1,0	0,1	1,5
ClearCa-16	0,2	0,2	2,0	0,4	3,0	7,2	37
ClearCa-17	1,7	8,4	5,9	1,2	1,7	*	*
ClearCa-18	0,3	0	1,0	0	1,0	0,2	1,7
ClearCa-19	1,0	0	1,0	0	1,0	8,8	9,8
ClearCa-20	3,2	1,9	1,6	1,9	1,6	8,1	3,5
ClearCa-21	0,3	2,1	8,0	0	1,0	7,3	25,3
ClearCa-22	0,2	0,6	4,0	0,1	1,5	*	*
ClearCa-23	0,4	1,1	3,8	0,1	1,3	*	*
ClearCa-24	1,5	0,2	1,1	0,1	1,1	13,8	10,2
ClearCa-25	1,1	7,4	7,7	1,4	2,3	*	*
Chromphi-1	0,9	1,0	2,1	0,4	1,4	1,3	2,4
Chromphi-2	0,3	0,3	2,0	0	1,0	3,2	11,6
Chromphi-3	0,2	0	1,0	0,1	1,5	0,6	4,0
Chromphi-4	3,0	0	1,0	0,2	1,1	0	1,0
Chrompho-A	0,8	0,5	1,6	0,2	1,3	4,0	6,0

Tabelle 3.1.: Basale Apoptoserate (BAD), spezifische Apoptoserate (SAD) und Apoptose-Anreicherungs-Faktor (AEF) nach Behandlung mit CH11 (500 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) oder CH11 (500 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml) bei 30 Nierenkarzinomzelllinien.
 *: weniger als 10^3 Zellen überlebten, sodass eine genaue Auswertung nicht möglich war.
 Die grau unterlegten Kästchen geben die als sensitiv definierten Zelllinien wieder.

Die Kombination der beiden Substanzen erhöhte den Anteil der sensitiven Zelllinie erheblich. Die Apoptoseresistenz konnte bei 22 der 30 untersuchten Zelllinien überwunden werden. Hier waren Apoptoseraten bis zu 48,9% (ClearCa-6) zu verzeichnen. Bei den mit * gekennzeichneten Zelllinien war die apoptotische Antwort sogar so stark, dass eine zu geringe Zellzahl für die Auswertung bleibt (Tabelle 3.1.). Lediglich acht Zelllinien zeigten sich weiterhin resistent gegenüber einer Apoptoseinduktion mit CH11 + INF- γ .

3.2 PCR-Amplifikation des CD95-Rezeptors

Das CD95-System stellt einen Hauptweg der Apoptose dar (Fulda et al, 1997). Aus diesem Grunde ist eine Untersuchung auf Apoptose-Resistenzmechanismen hier besonders interessant. Während der membrangebundene CD95-Rezeptor eine Apoptose-induzierende Wirkung besitzt, stellt der lösliche Rezeptor eine inhibierende Form dar, die kompetitiv den Liganden binden kann.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Produkte waren für alle untersuchten Zelllinien zwei Banden zu erkennen: der membrangebundene Rezeptor mit 510 bp und die lösliche Spleißvariante sCD95 (447 bp) (Abb. 3.1).

Um sicherzustellen, dass es sich bei den PCR-Produkten tatsächlich um den gesuchten CD95-Rezeptor und dessen Spleißform handelte, wurde die cDNA Sequenz nach Aufreinigung durch automatisches Sequenzieren überprüft und auf diese Weise die Identität der beiden CD95-Formen bestätigt.

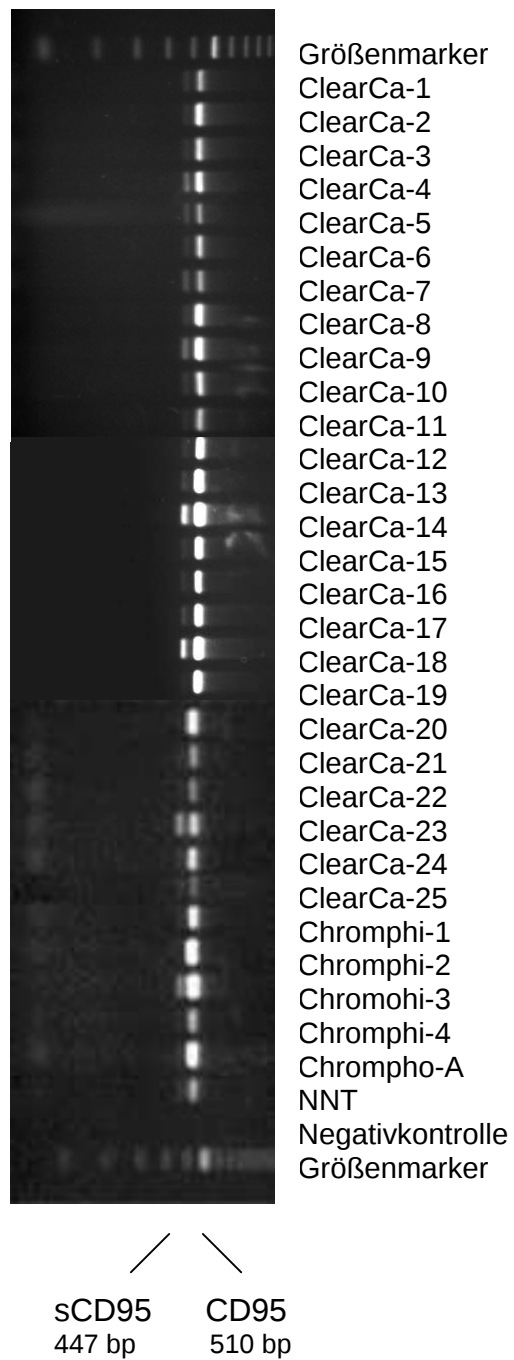


Abb. 3.1.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von membrangebundenem CD95-Rezeptor (510 bp) und der löslichen Spleißform sCD95-Rezeptor (447 bp) im Nierenzellkarzinom. NNT = nicht-neoplastische Tubulusepithelien

Wie in der Abb. 3.1. zu erkennen ist, zeigten sowohl alle 30 Nierenkarzinomzelllinien als auch die Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubuluszellen eine Koexpression des membrangebundenen und löslichen CD95-Rezeptors. Obwohl alle Zelllinien eine Dominanz des membrangebundenen Rezeptors zeigten, ergaben sich Unterschiede im Verhältnis der beiden Formen zueinander

Die Zelllinien ClearCa -14, -17, -23 und Chromphi-3 wiesen eine vergleichsweise starke Expression des löslichen Rezeptors auf. Dagegen ergab sich für die Zelllinien ClearCa-20 und Chromphi-2 ein sehr schwaches Signal. Alle übrigen Zelllinien einschließlich den nicht-neoplastischen Tubulusepithelien zeigten eine mittlere Signalstärke für den löslichen Rezeptor verglichen mit dem membrangebundenen Rezeptor (Abb. 3.1.).

Das Diagramm (Abb. 3.2.) verdeutlicht die Verteilung der Verhältnisse zwischen CD95/sCD95. Die Ergebnisse sind gemittelte Werte aus sechs RT-PCR-Reaktionen, die densitometrisch ausgewertet wurden. Ein Verhältnis von 10-20fach bedeutet beispielsweise, dass die Intensität des transmembranen CD95-Signals 10-20mal stärker war, als diejenige des sCD95-Rezeptors.

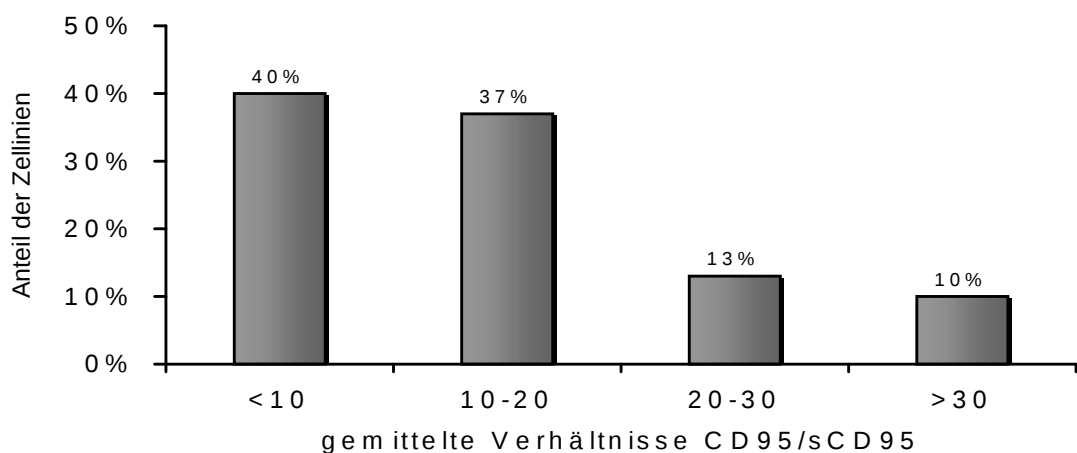


Abb. 3.2.: Verteilung der Mittelwerte des Verhältnisses CD95/sCD95. Die Intensität der Amplifikationsprodukte wurden densitometrisch bestimmt und diese ins Verhältnis zueinander gesetzt. Es wurden insgesamt 6 Messungen pro Zelllinie durchgeführt.

Ein Großteil der Tumoren (40%) besaß ein- bis zehnmal soviel mRNA für den membrangebundenen wie für den löslichen CD95-Rezeptor. Nur in zehn Prozent der Fälle zeigte der membrangebundene Rezeptor eine über 30fache Expression.

Es bestand keine Korrelation zwischen dem Verhältnis der beiden CD95 Spleißvarianten und der basalen Apoptoserate (BAD) sowie der Sensitivität gegenüber einer CH11-induzierten Apoptose der Nierenkarzinomzelllinien.

3.3 Nachweis des löslichen CD95-Rezeptors im Zellkulturüberstand

Im nächsten Schritt wurde der Expressionsstatus des löslichen CD95-Rezeptors im Zellkulturüberstand der Nierenzellkulturen mittels eines spezifischen ELISA-Tests untersucht.

Für die Versuche wurden Zellkulturüberstände von sieben zufällig ausgesuchten Nierentumorzelllinien nach drei Tagen Inkubation mit Nährmedium gewonnen.

Tumortyp	Stadium	Diff.-Grad	sCD95-Konzentration
ClearCa-3	pT3a	G2	1,1 ng/ml
ClearCa-6	pT3b	G3	0,2 ng/ml
ClearCa-17	pT3a	G3	0,9 ng/ml
ClearCa-19	pT2	G2	0,1 ng/ml
ClearCa-23	pT2	G1	0,2 ng/ml
ClearCa-26	pT2	G1	0,4 ng/ml
Chromphi-1	pT3b	G3	0,2 ng/ml

Tabelle 3.2.: ELISA-Untersuchungen zur Konzentrationsbestimmung des löslichen CD95-Rezeptors im Zellkulturüberstand zufällig ausgesuchter Nierenkarzinom-Zelllinien nach 72 Stunden Kultivierung.

Wie aus der Tabelle 3.2. hervorgeht, lag die Konzentration des löslichen CD95-Rezeptors im Zellkulturüberstand dieser Zelllinien zwischen 0,1 bis 1,1 ng/ml. Insgesamt waren die Werte sehr niedrig verglichen mit anderen Tumoren, für die Konzentrationen zwischen 20 und 40 ng/ml gemessen wurden (Midis et al., 1996).

Darüber hinaus ergaben sich für die jeweiligen Differenzierungsgrade folgende Konzentrationen:

G1	0,2- 0,4 ng/ml
G2	0,1- 1,1 ng/ml
G3	0,2- 0,9 ng/ml

Somit ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der sCD95-Rezeptor-Konzentration bei den untersuchten Zellkulturüberständen herstellen. Dasselbe galt für den Vergleich mit dem Tumorstadium.

Auch im Vergleich zur basalen Apoptoserate oder zum Ausmaß der Apoptoseinduktion nach CH11-Exposition konnte kein Zusammenhang mit der sCD95-Konzentration ermittelt werden.

Die Konzentration des löslichen CD95-Rezeptors bot keine Erklärung für die Sensitivitätslage der Zelllinien gegenüber CH11. Trotzdem war sCD95 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar. Die Ergebnisse aus dem ELISA-Test beweisen, dass der lösliche Rezeptor an die Umgebung abgegeben wird und somit dem Nierenzellkarzinom als Apoptoseinhibitor zur Verfügung steht.

3.4 Nachweis des löslichen CD95-Rezeptors in Patientenseren

Die Arbeitsgruppe um Midis konnte erhöhte sCD96-Rezeptor-Konzentrationen bei Patienten mit Leukämie, Ovarial- bzw. Bronchial-Karzinomen feststellen (Midis et al., 1996). Hier sollte nun geprüft werden, ob auch Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt waren, solche erhöhten sCD95-Konzentrationen im Serum aufwiesen, und ob sich ein Unterschied zwischen der prä- und der postoperativen Konzentration des löslichen CD95-Rezeptors zeigte.

Zu diesen Zweck wurde bei zwölf Patienten unmittelbar vor der Operation und 8-15 Tage noch dem Eingriff Blut entnommen und Serum hergestellt. Es wurden Nierenzellkarzinome der verschiedenen Tumorstadien, Differenzierungsgrade und Tumortypen mit dem selben ELISA-Test wie in

Kapitel 3.3 untersucht (Tabelle 3.3.) und zur Kontrolle das Serum von vier gesunden Probanden getestet (Tabelle 3.4).

Patient	Alter	Geschl.	Tumor-Typ	Tumor-Stadium	Diff.-Grad	sCD95 Konzentration (ng/ml)	
						A	B
1	78	m	ClearCa	pT1, Nx, Mx	G2	3,18	3,50
2	59	m	ClearCa	pT1, Nx, Mx	G2	2,21	3,25
3	54	m	ClearCa	pT2, Nx, Mx	G2	3,31	4,32
4	61	m	ClearCa	pT2, N0, Mx	G2	<1	1,44
5	61	m	ClearCa	pT3a, N0, M1	G2	2,00	3,48
6	60	m	ClearCa	pT2, pN1, M1	G3-4	1,27	2,21
7	64	m	ClearCa	pTx, pNx, M1	G2	4,81	6,08
8	61	m	ClearCa	pT2, N0, Mx	G3	1,12	2,63
9	56	w	ClearCa	pT1, N0, M0	G1	2,62	3,68
10	62	w	ClearCa	pT3b, N0, M0	G2	2,78	3,52
11	77	w	ClearCa	pT1, pN0, Mx	G2	1,60	3,13
12	60	m	Chromphi	pT2, N0, M0	G2	3,78	4,02

Tabelle 3.3.: Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen an 12 Tumorpatienten
m = männlich, w = weiblich, A = präoperativ, B = postoperativ,
Alter in Jahren

Kontrolle	Alter	Geschlecht	sCD95-Konzentration (ng/ml)
1	23	w	2,77
2	22	m	3,27
3	23	m	2,21
4	35	m	1,78

Tabelle 3.4.: Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen an vier gesunden Probanden
m = männlich, w = weiblich

Dabei stellte sich heraus, dass die Konzentration des löslichen Rezeptors vor der Nephrektomie geringer war als nach dem Eingriff. Im Mittel ergaben sich folgende Werte:

präoperativ	2,4 ng/ml $\pm$ 1,12 ng/ml
postoperativ	3,33 ng/ml $\pm$ 1,12 ng/ml
gesunden Probanden	2,51 ng/ml $\pm$ 0,65 ng/ml

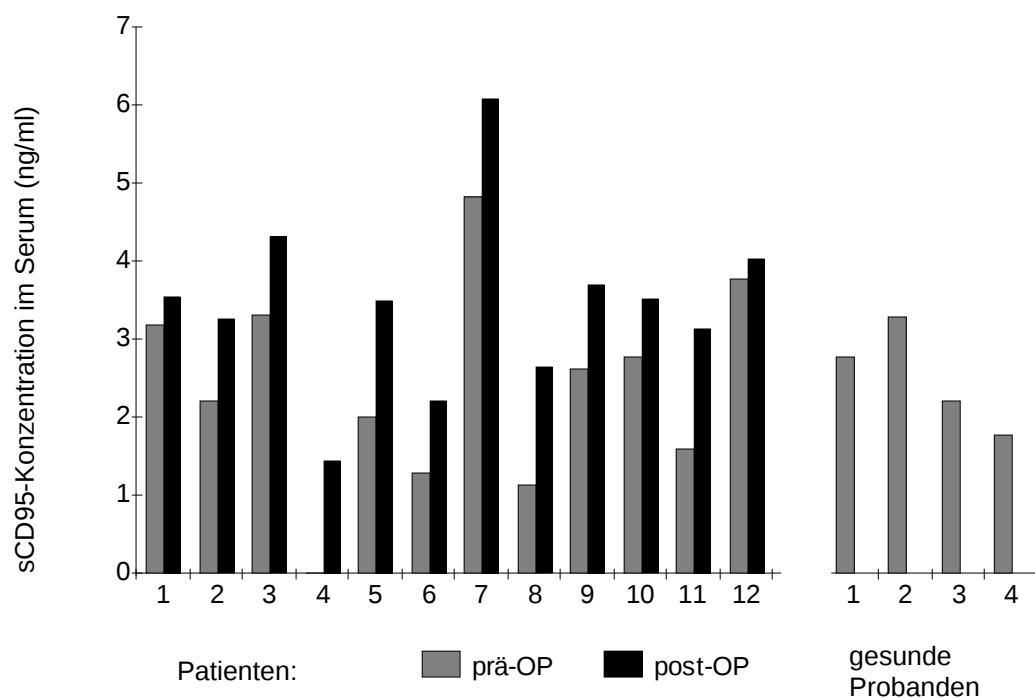


Abb. 3.3.: Konzentration des löslichen CD95-Rezeptors in Serum von Nierenzellkarzinompatienten vor und nach Nephrektomie und von gesunden Probanden. Die präoperative Konzentration lag bei dem Patienten Nr.4 unter der Nachweisgrenze

Darüber hinaus zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der sCD95-Konzentration von Nierenzellkarzinompatienten und gesunden Probanden (Abb. 3.3)

3.5 Proteinexpression des CD95-Rezeptors

Ergänzend zu der Analyse des löslichen CD95-Rezeptors mittels ELISA, untersuchten wir 16 Nierenkarzinomzelllinien und eine Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubuluszellen im Western Blot bezüglich der Spleißvarianten des CD95-Rezeptors.

Obwohl der verwendete Antikörper sowohl die membrangebundene, als auch die lösliche CD95-Spleißform erkennen konnte, wurde in unseren Versuchen ausschließlich die transmembrane Variante detektiert (Abb. 3.4). Das ließ darauf schließen, dass die lösliche Form nicht innerhalb der Zelle gespeichert wird, oder die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Trotz gleicher Proteinmengen (20 ng) gab es sehr starke Schwankungen bei der Expression des CD95-Rezeptors. Die Zelllinien ClearCa-3, -4, -8 und -9 zeigten eine sehr starkes Signal, während die Zelllinie ClearCa -1, -5, -6, -11, -15, -26, Chromphi-2, -3, -4 und die chromophobe Zelllinie eine mittlere Expressionsstärke aufwiesen (Abb. 3.4.).

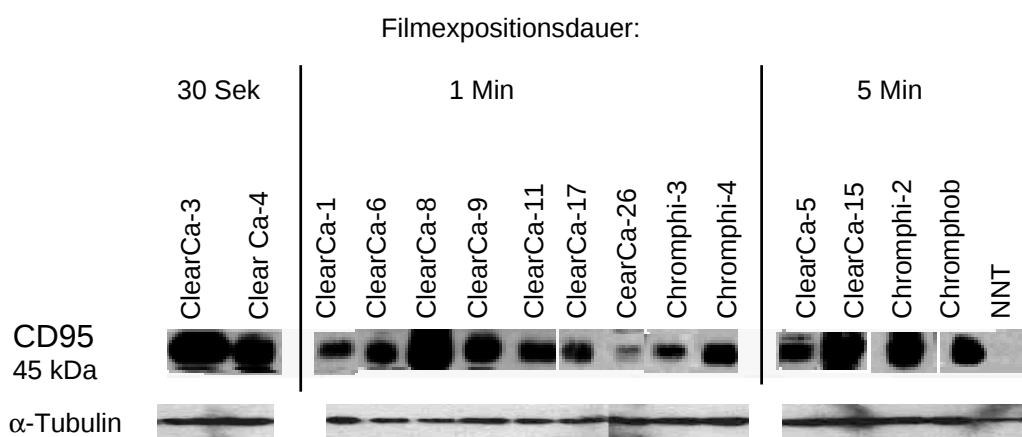


Abb. 3.4.: Darstellung der Expressionsstärke des CD95-Rezeptors mittels Western Blot Analyse an 16 ausgewählten Nierentumorzelllinien und einer Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubulusepithelien (NNT). Das CD95 Protein hat eine Molekulargewicht von 45 kDa (Kilo-Dalton). Zur Kontrolle wurde α -Tubulin mitgeführt und einheitlich 1 Minute exponiert

Um eine bildliche Darstellung der starken Expressionsunterschiede zu ermöglichen, wurde unterschiedliche Expositionszeiten abgebildet.

Hervorzuheben ist noch die Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubuluszellen, die auf Proteinebene keine CD95-Expression erkennen ließ.

3.6 PCR-Amplifikation des CD95-Liganden

Für die Funktionalität des CD95-Systems ist neben dem Rezeptor auch der Ligand von entscheidender Bedeutung, der über eine Trimerisierung des Rezeptors diesen aktiviert und damit die Apoptosesignalkaskade einleitet. Der Nachweis des Liganden würde den Nierenkarzinomzellen einerseits die Möglichkeit zum Brudermord an den Nachbarzellen geben. Andererseits könnte es aber auch andere CD95-positive Zellen, wie beispielsweise immunkompetente Zellen in die Apoptose treiben und somit über den „Immune-escape-Mechanismus“ das eigene Überleben sichern.

Die Expression des CD95-Liganden wurde an zehn zufällig ausgewählten Nierenkarzinomzelllinien mittels RT-PCR untersucht. Alle zehn untersuchten Nierenkarzinomzelllinien zeigten eine äußerst schwache Expression des CD95-Liganden. Die Expressionsstärke unterschied sich zwischen den Zelllinien nicht wesentlich. Im Gegensatz dazu ist der CD95-Ligand in Interleukin-2 und Concanavalin A aktivierten Lymphozyten (PBL), die aus Frischblut gewonnen und zum Vergleich untersucht wurden, sehr stark exprimiert (Abb. 3.5.). Concanavalin A führt zu einer unspezifischen Aktivierung der Lymphozyten durch Agglutination.

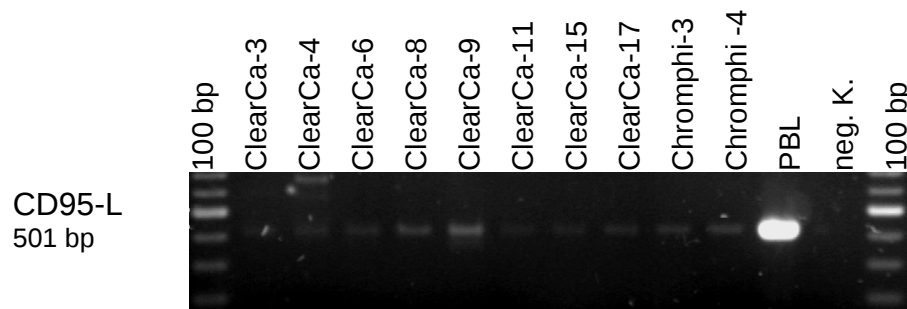


Abb. 3.5.: Gelelektrophoretische Auftrennung von RT-PCR-Produkten zum Nachweis des CD95-Liganden (501 bp)
PBL = periphere Blutlymphozyten, neg. K. = Negativkontrolle

Demnach ist der CD95-Ligand als Apoptoseinhibitor im Nierenzellkarzinom nachweisbar, zeigt aber eine sehr geringe Expressionsstärke.

3.7 Expression von LARD im Nierenzellkarzinom

Neben dem CD95-System gibt es noch weitere Apoptosesysteme, deren Dysregulation zur Tumorentstehung und Progression sowie zur Therapieresistenz beitragen können. So ist die gestörte Apoptoseinduktion durch Modulation von LARD ein weiterer potentieller Inhibitionsmechanismus des programmierten Zelltodes im Nierenzellkarzinom. Dabei ist insbesondere das Expressionsmuster der Apoptose-induzierenden (LARD1a und LARD1b) und –löslichen (LARD2 und LARD3) Spleißvarianten von Interesse.

Die Expression der LARD-Spleißvarianten wurde mittels RT-PCR untersucht. Nach der Amplifikation kamen drei Banden zur Darstellung (Abb. 3.6.). Die Sequenzierung nach vorheriger Clonierung ergab, dass es sich um folgende LARD-Spleißformen handelte:

LARD1a/b (547 bp)	aktiv und Apoptose-induzierend
LARD2 (666 bp)	Apoptose-inhibierend
LARD3 (491 bp)	Apoptose inhibierend

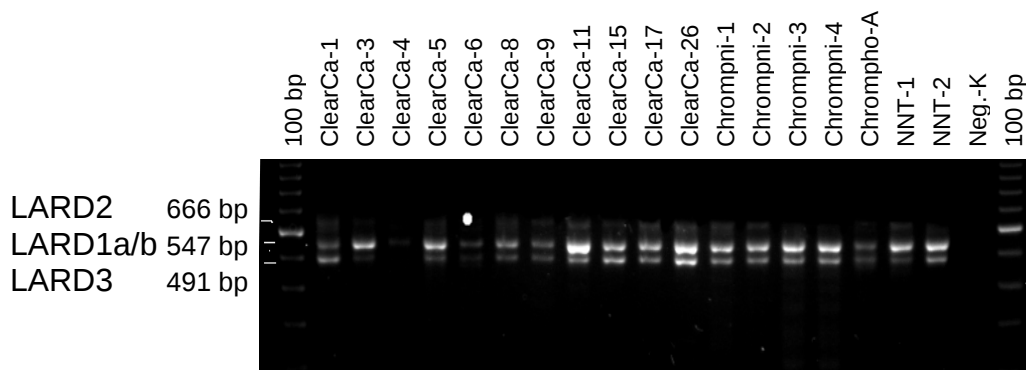


Abb. 3.6.: Gelelektrophoretische Auftrennung von RT-PCR-Produkten zum Nachweis von LARD1a/b und den Spleißvarianten LARD2 und LARD3
NNT = nicht-neoplastische Tubulusepithelien

Das größte Amplifikationsprodukt (666 bp) (Abb. 3.6.) repräsentierte LARD2 und war identisch mit sDR3, dem von Warzocha beschriebenen löslichen Todesrezeptor 3 (Warzocha et al. 1998). Eine Insertion von 101 bp im Exon 3 vor der Transmembrandomäne führt zu einer Verschiebung im Leserahmen, so dass ein neues Stopcodon entsteht, bevor die Transmembranregion translatiert werden kann (Warzocha et al., 1998) (Abb. 1.7.). LARD2 konnte in allen 16 Nierenkarzinomzelllinien und den beiden Kurzzeitkulturen nicht-neoplastischer Tubuluszellen nachgewiesen werden, wobei die Zelllinien ClearCa-3, -4, -6, Chromphi-3, -4 und Chrompho-A ein sehr schwaches Signal aufwiesen. Bei allen anderen Tumorzelllinien war LARD2 stärker exprimiert, jedoch immer noch schwächer als LARD1 oder LARD3

Die mittlere Bande (547 bp) entsprach LARD1 (a/b), von Warzocha als DR3 benannt. Hierbei handelte es sich um das vollständige Transkript mit allen vier cysteinreichen Regionen extrazellulär (Warzocha et al., 1998). LARD1b weist eine Insertion von drei Basenpaaren an Position 709 auf im Gegensatz zu LARD1a (Screaton et al., 1997). Bei unserer Primerwahl (659-679) wurde dieser Bereich nicht miterfasst, sodass eine Unterscheidung auch durch Sequenzierung hier nicht möglich war (Abb. 1.7.).

In allen untersuchten Zelllinien zeigte LARD1 das stärkste Signal, war jedoch bei ClearCa-4 und -6 vergleichsweise schwach exprimiert, während die Zelllinien ClearCa-11 und -26 ein sehr starkes Signal aufwiesen (Abb. 3.6.).

Dem kleinsten Produkt, LARD3, (491 bp) fehlt das Exon 6. Durch den Spleißvorgang verschiebt sich der Leserahmen, und es entsteht ein neues Stopcodon am Anfang der Transmembranregion (Abb. 1.7.).

Die Zelllinie ClearCa-4 zeigte keine Expression für LARD3, jedoch war das Signal bei ClearCa-3, -6 Chromphi-1 und der ersten Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubuluszellen sehr schwach, während ClearCa-26 eine sehr starke Expression zeigte. Alle anderen untersuchten Zelllinien zeigten eine mittlere Expressionsstärke.

Zusammenfassend war festzustellen, dass die Zelllinien ClearCa-4, -6 und Chromphi-1 eine sehr geringe Expression aller Spleißformen aufwiesen, wohingegen ClearCa-11 und -26 durchweg starke Signale boten.

Analog zu den Untersuchungen des CD95-Rezeptors wurde auch hier das Verhältnis des Apoptose-induzierenden Rezeptors LARD1 zu den inhibitorisch wirkenden Formen LARD2 und LARD3 ermittelt.

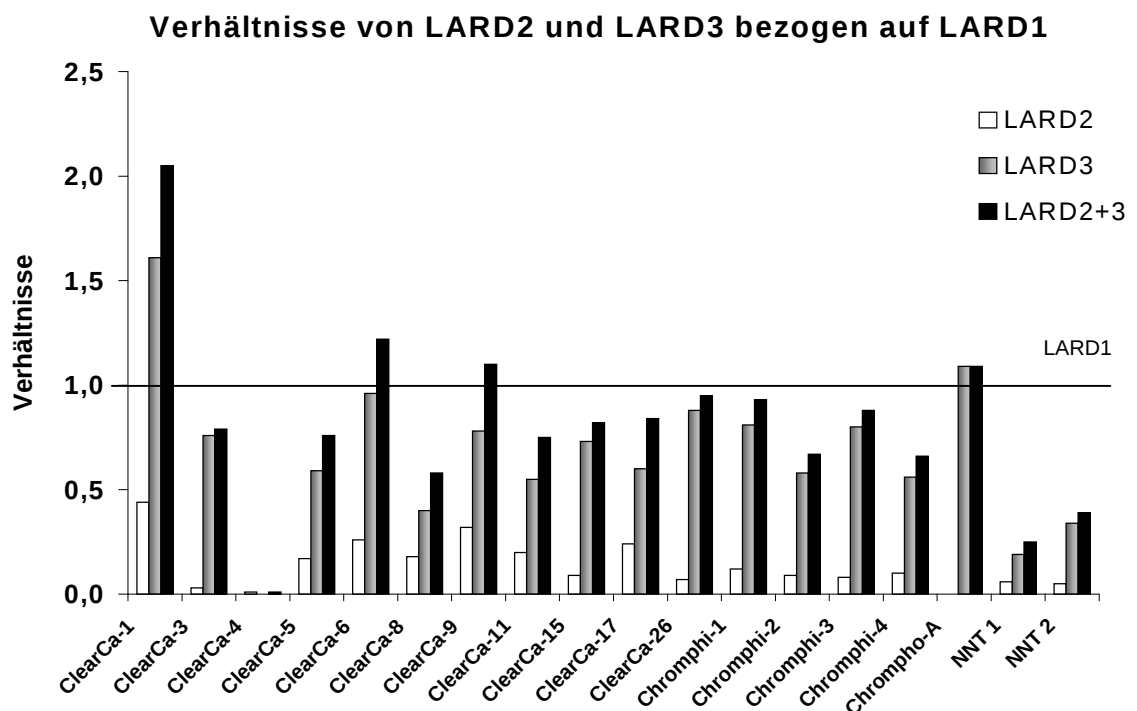


Abb. 3.7.: Vergleich der Verhältnisse der inhibitorischen Spleißformen LARD2 und LARD3 bezogen auf die proapoptotische Form LARD1 (=1) bei 16 ausgewählten Nierenkarzinomzelllinien und zwei nicht neoplastischen Nierentubulusepithelien (NNT)

Das Diagramm (Abb. 3.7.) zeigt, dass die Spleißformen 2 und 3 getrennt betrachtet schwächer vertreten sind als LARD1 mit Ausnahme der Zelllinien ClearCa-1 und Chrompho-1. Fasst man die löslichen und damit möglicherweise apoptoseinhibierenden Varianten jedoch zusammen, liegt das Verhältnis von zwei weiteren Zelllinien (ClearCa-6 und -9) über 1, d.h., dass die potentiell inhibierenden Rezeptoren LARD2 und LARD3 überwiegen. Bei allen anderen Zelllinien dominiert die Apoptose-induzierende Spleißform LARD1.

Die beiden mitgeführten Kurzzeitkulturen nicht-neoplastischer Tubuluszellen wiesen eine sehr geringe LARD2- und LARD3-Expression auf.

3.8 Expression von Osteoprotegerin

Im Hinblick auf das TRAIL-System, das neben CD95 von wachsendem Interesse bei der Analyse des programmierten Zelltodes ist, stellt OPG einen sehr interessanten Apoptose-inhibierenden Mechanismus dar. Als sekretorischer Rezeptor kann er TRAIL vor dessen Bindung mit den Apoptose-induzierenden Rezeptoren DR4 und DR5 abfangen, und so kompetitiv deren Aktivierung hemmen.

Bei unseren Untersuchungen konzentrierten wir uns auf die Grundcharakterisierung der Nierenkarzinomzelllinien bezüglich der Expression von OPG auf mRNA Ebene. Auch in diesem Fall wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt und das Amplifikationsprodukt mittels Sequenzierung auf seine Identität überprüft.

Hier stellte sich ein uneinheitliches Bild der Nierenkarzinomzelllinien und der beiden Kurzzeitkulturen nicht-neoplastischer Tubuluszellen dar. OPG war in allen Zelllinien außer ClearCa-5 nachweisbar (Abb. 3.8.). Diese Zelllinie zeigte eine sehr geringe basale Apoptoserate mit 0,8%. Auch nach Stimulation mit CH11, IFN- γ und CH11 + IFN- γ stieg die spezifische Apoptoserate nicht über 1,5% an.

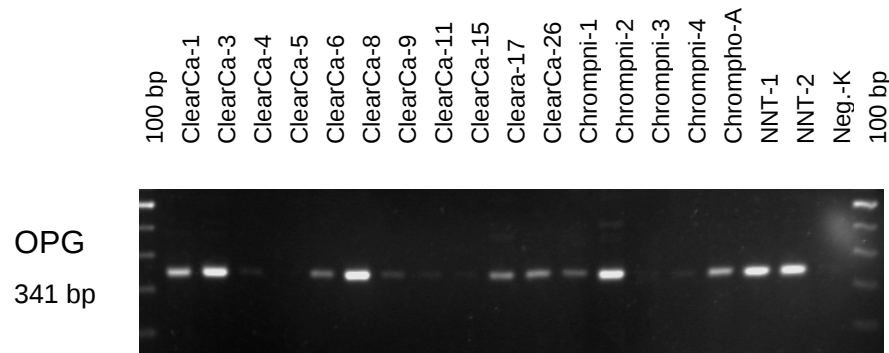


Abb. 3.8.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von OPG (341 bp) im Nierenkarzinomzelllinien. NNT = nicht-neoplastische Nierentubuluszelllinien

Die Zelllinien ClearCa-4, ClearCa-9, ClearCa-11, ClearCa-15, Chromphi-3 und Chromphi-4 zeigten ein sehr schwaches Signal, wohingegen die Zelllinien ClearCa-3, ClearCa-8, Chromphi-2 und die beiden Kurzzeitkulturen nicht-neoplastischer Tubuluszellen eine sehr starke Expression aufwiesen. Alle übrigen Zelllinien zeigten ein mittleres Expressionsniveau. Hier lässt sich jedoch kein einheitliches Muster zur basalen oder spezifischen Apoptoserate nach CH11-Stimulation feststellen.

Trotzdem konnte gezeigt werden, dass dem Nierenzellkarzinom mit OPG ein weiterer Apoptose-inhibierender Faktor zur Verfügung steht.

3.9 Proteinexpression von Pro-Caspase-8

Im weiteren Verlauf der Apoptose wird die Caspasen-Kaskade eingeleitet, wobei die Initiator-Caspase-8 bei vielen Signalwegen zuerst aktiviert wird.

In Abb. 3.9. ist eine Protein-Expression der Caspase-8a (55,4 kDa) und Caspase-8b (53,7kDa) in allen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien zu erkennen. Ein Aktivitätsunterschied zwischen beiden Spleißformen ist bisher nicht festgestellt worden (Scaffidi et al., 1997).

Die Zelllinien ClearCa-3, -5, -6 und -8 zeigten ein sehr starkes Signal, wohingegen die Expression bei ClearCa-4, Chromphi-2 und -3 und die Kurzzeitkulturen nicht-neoplastischer Tubuluszellen sehr viel schwächer war. Alle übrigen Zelllinien zeigten eine mittlere Expressionsstärke.

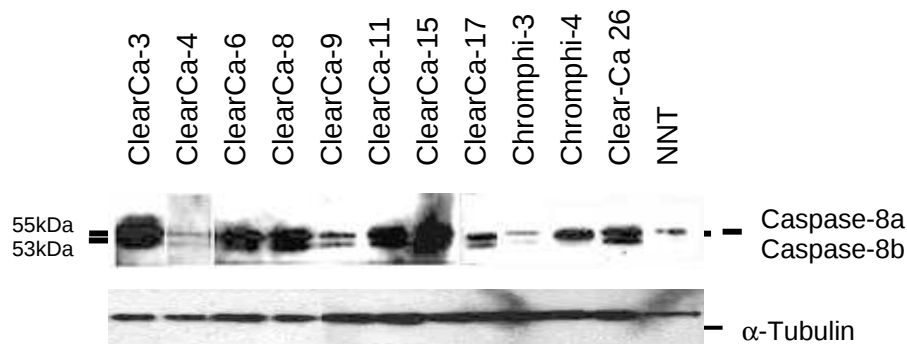


Abb. 3.9.: Darstellung der Expressionsstärke der beiden Procaspase-8-Spleißformen 8a (55kDa) und 8b (53kDa) mittels Western Blot Analyse an 10 ausgewählten Nierenkarzinomzelllinien und einer Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubuluszellen. NNT = nicht-neoplastische Nierentubulusepithelien

Bei Vergleichen mit der basalen Apoptoserate (BAD) der Zelllinien und der spezifischen Apoptoserate nach CH11 und INF- γ -Behandlung (SAD) konnte keine Korrelation zu dem Ausmaß der Proteinexpression von Caspase-8 festgestellt werden.

Durch diesen Versuch konnte ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der Caspase-8 Ursache der Apoptoseresistenz im Nierenzellkarzinom ist. Eine Inhibition dieser Initiator-Caspase ist jedoch denkbar.

3.10 Expression der Caspaseinhibitoren FLIP_L und FLIP_S

Eine weitere Möglichkeit der Apoptose-Inhibition ist die Expression der Caspaseinhibitoren FLIP_L und FLIP_S, die durch Interkalation zwischen FADD und Caspase-8 die Aktivierung dieser Caspase verhindern können (Tepper et al., 1999).

Bei allen untersuchten Zelllinien ließ sich sowohl FLIP_S als auch FLIP_L nachweisen, wobei FLIP_S durchweg stärker exprimiert wurde. Die Zelllinien ClearCa-6, -9, Chromphi-3 und -4 zeigten ein geringfügig stärkeres Expressionssignal für FLIP_S (Abb. 3.10). In den Zelllinien ClearCa-4 und -6 war kaum ein RT-PCR Amplifikat für FLIP_L nachweisbar, während ClearCa-15, Chromphi-3 und -4 die stärkste Expression zeigten (Abb. 3.10).

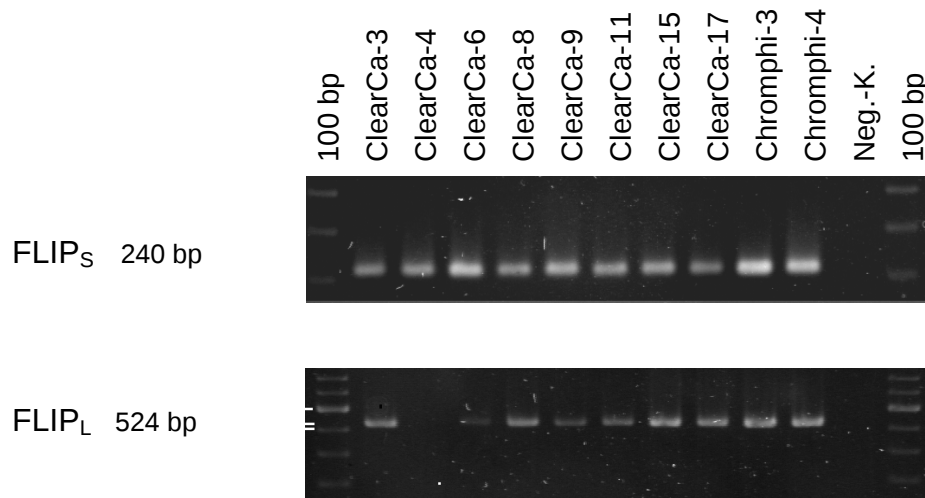


Abb. 3.10.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von FLIP_L (524 bp) und FLIP_S (240 bp) im Nierenkarzinomzelllinien; neg. K. =Negativkontrolle

Eine Inhibition der Apoptose an einem zentralen Punkt der Signalkaskade ist durch den oben geführten Nachweis des Caspase-8-Inhibitors FLIP demnach denkbar und ergänzt die Zahl der Inhibitionsfaktoren, die dem Nierenzellkarzinom zur Verfügung stehen.

3.11 Expression von Pro-Caspase-9

Im weiteren Verlauf der Caspasen-Kaskade wird die Caspase-9 von der Caspase-8 aktiviert. Alternativ kann eine Caspase-9-Aktivierung auch über eine direkte Mitochondrienstimulation erfolgen. Bei der mitochondrien-abhängigen Apoptoseinduktion wird nach der Cytochrom C Ausschüttung über Apaf-1 als erstes die Caspase-9 aktiviert. Durch Bid sind die Rezeptor- und die Mitochondrien-vermittelten Apoptosewege miteinander verbunden (Abb. 1.1).

Eine Inhibition der Apoptose an dieser Stelle, beispielsweise über die Spleißform Caspase-9s, der die proteolytische Domäne fehlt, würde ein Tumorstadium begünstigen, da durch einen einzigen Inhibitionsmechanismus gleich mehrere Wege des programmierten Zelltodes gestört würden.

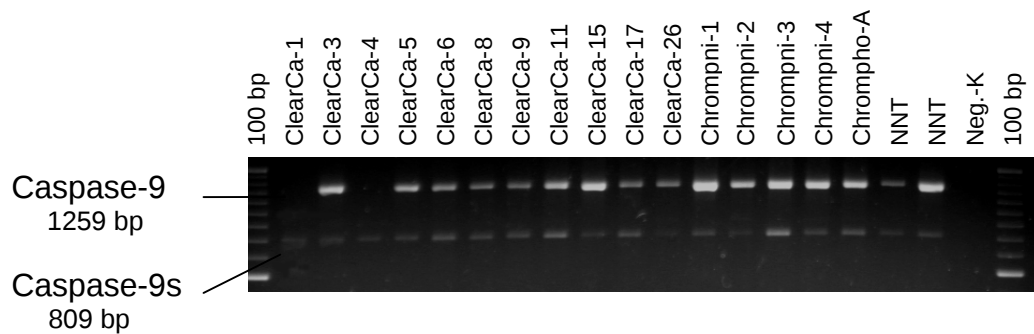


Abb. 3.11.: RT-PCR-Produkte zum Nachweis von Caspase-9 (1259 bp) und der Spleißvariante Caspase-9s (809 bp) in Nierenkarzinomzelllinien

Alle untersuchten Zelllinien wiesen in der RT-PCR ein Signal sowohl für die Caspase-9 als auch für die Spleißvariante Caspase-9s auf, mit Ausnahme der Zelllinien ClearCa-1 und –4, die kein Signal für die Apoptose-induzierende Caspase-9 zeigten. Obwohl die Expressionsstärke der einzelnen Zelllinien uneinheitlich war, zeigte Caspase-9s stets ein schwächeres Signal mit Ausnahme der bereits erwähnten Zelllinien.

Ein Zusammenhang mit der basalen Apoptoserate der Nierenkarzinomzelllinien konnte nicht dargestellt werden. Insbesondere die Zelllinien ClearCa-1 und ClearCa-4, bei denen die Caspase-9 nicht nachgewiesen werden konnte, zeigten eine relativ hohe BAD von 2,2% bzw. 1,1%.

4 Diskussion

Eine Therapieresistenz von Karzinomen gegenüber Zytostatika, Bestrahlung und Immunmodulation stellt ein erhebliches Problem bei der Behandlung von Tumorpatienten dar. Da diese Therapiemethoden über die Aktivierung des programmierten Zelltodes wirken, ist eine Störung des Apoptosewegs wahrscheinlich mitentscheidend für die schlechten Ansprechraten (Krammer, 1997, Binder et al., 1996). Am Beispiel des Nierenzellkarzinoms wurden einige Modulatoren der Apoptose untersucht, die eine Bedeutung für die Therapieresistenz dieser Tumoren besitzen können.

Die Induktion und Inhibition der Apoptose unterliegt vielfältigen Regulationsfaktoren. Einerseits gibt es die Rezeptor-Liganden-Systeme, welche die Apoptose einleiten (z. B. CD95 und LARD mit ihren Liganden) (Trauth et al., 1989; Marsters et al., 1996) oder aber inhibieren können (wie der sekretorische Rezeptor OPG) (Simonet et al., 1997). Für Zytostatika konnte eine Apoptoseinduktion über die Aktivierung der Todesrezeptoren nachgewiesen werden (Ochs et al., 2000).

Andererseits ist die Caspasen-Kaskade im Inneren der Zelle zu erwähnen, die das Apoptosesignal unter anderem an die Mitochondrien weiterleitet (Liu et al., 2000; Thornberry et al., 1998) und sowohl Rezeptor-abhängig als auch Rezeptor-unabhängig aktiviert werden kann. Für die Chemotherapie und Bestrahlung konnte ein Rezeptor-unabhängiger Weg zur Einleitung des programmierten Zelltodes nachgewiesen werden (Ochs et al., 2000). Durch die Modulation an einem oder mehreren Faktoren kann es zur Ausbildung einer Apoptose-Inhibition und damit zur Therapieresistenz kommen. Einige dieser Inhibitionsmechanismen wurden in dieser Arbeit beleuchtet.

Da es in der Literatur viele Hinweise auf die zentrale Rolle des CD95-Rezeptors bei der Apoptose gibt, wurden Nierenkarzinomzelllinien bezüglich dieses Systems einschließlich des kompetitiv wirkenden löslichen CD95-Rezeptors „**sCD95**“ charakterisiert, (Fulda et al., 1997).

Daneben betrachteten wir aber auch das Expressionsmuster des Todesrezeptors **LARD** mit einigen seiner löslichen und möglicherweise inhibitorisch wirkende Spleißvarianten.

Nicht zuletzt wurde der sekretorische Rezeptor **OPG** untersucht, der als kompetitiver Rezeptor das TRAIL-System inhibieren kann (Emery et al., 1998).

Aber auch die Caspasen-Kaskade bietet viele Angriffsmöglichkeiten, um den programmierten Zelltod zu blockieren. Hier sind insbesondere die Regulatorproteine **Caspase-9s** und **FLIP_{LS}** zu nennen (Irmeler et al., 1997; Seol et al., 1999). Da die Caspasen-Kaskade im Zentrum verschiedener Apoptose-Signalwege steht, könnte es hier zu einer besonders effektiven Inhibition kommen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass humane Nierenzellkarzinome über eine große Variationsbreite von Apoptose-inhibierender Faktoren verfügen, die alle die Therapieresistenz dieses Tumors mitverursachen können.

4.1 Bedeutung des CD95-Systems für das Nierenzellkarzinom

Das CD95-System gilt als ein wichtiger Apoptose-Induktor. Über die Aktivierung des CD95-Rezeptors durch Bindung des Liganden kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors mit Ausbildung einer intrazellulären Todesdomäne (death domain). An diese Todesdomäne bindet das Adaptermolekül FADD und vervollständigt den DISC (death-inducing-signaling-complex), der wiederum mit der Initiator-Caspase-8 interagieren kann. Caspase-8 wird hierdurch aktiviert und kann durch Interaktion mit weiteren Effektor-Caspasen das Apoptosesignal weiterleiten (Abb. 1.1) (Kischkel et al., 1995; Boldin et al., 1996).

Der lösliche CD95-Rezeptor konkurriert mit dem membrangebundenen Rezeptor um den Liganden. So kann die Aktivierung des CD95-Systems durch das Abfangen des Liganden inhibiert werden (Midis et al., 1996). Bei der adulten T-Zell Leukämie wurde die Inhibition des programmierten Zelltodes durch den löslichen CD95-Rezeptor bereits beschrieben (Sugahara et al., 1997).

Da die Zytostatika-induzierte Apoptose –zumindest zum Teil- über die Aktivierung des CD95-Systems initiiert wird (Fulda et al., 1997), steht bei

einem Nachweis des löslichen CD95-Rezeptors den Nierenkarzinomzellen ein wirksamer Resistenzmechanismus zur Verfügung.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte der lösliche CD95-Rezeptor neben dem membrangebundenen in allen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Betrachtet man das Expressionsverhältnis der beiden Formen in der RT-PCR, so fiel auf, dass die lösliche Spleißvariante stets schwächer exprimiert wurde als die membrangebundene.

Untersuchungen des löslichen CD95-Rezeptors in unterschiedlichen Stadien einer Leukämie zeigten einen deutlichen Expressionsabfall des löslichen CD95-Rezeptors (sCD95) bei einer Tumorremission und einen erneuten Anstieg bei der Progression der Erkrankung (Sugahara et al., 1997). Des weiteren wiesen akute Leukämien ein höheres sCD95-Niveau auf als chronische Leukämien (Sugahara et al., 1997).

Unsere Analysen der unterschiedlichen Nierenkarzinome erbrachten dagegen keinen Zusammenhang zwischen dem CD95- bzw. sCD95-Expressionsniveau und dem Tumorstadium oder dem Differenzierungsgrad des Primärtumors. Auch fortgeschrittene Karzinome zeichneten sich nicht durch eine besonders starke sCD95-Expression aus. Bei Untersuchungen an Formalin-fixiertem Gewebe konnte durch immunhistochemischen Methoden jedoch ein deutlicher Anstieg des CD95-Rezeptors von gut differenzierten (G1) zu gering differenzierten (G3) Tumoren nachgewiesen werden. Eine Korrelation zum Tumorstadium oder dem Überleben des Patienten bestand jedoch nicht (Ramp et al., 2003). Möglicherweise verändert sich der Rezeptorstatus der Tumorzellen in der Zellkultur, um dem Brudermord auszuweichen.

Bei einigen Hepatomzelllinien (HepG2, Huh7, Hep3b) konnte der Verlust des CD95-Rezeptors - im Gegensatz zu den nicht-neoplastisch veränderten Leberparenchymzellen - beobachtet werden (Strand et al., 1996). Es entwickelte sich also eine Apoptoseresistenz bei den Tumorzellen.

Die Kurzzeitkultur nicht-neoplastischer Tubulusepithelien zeigten bei unseren Untersuchungen keinen Expressionsunterschied im Vergleich zu den Nierenkarzinomzelllinien in der RT-PCR. Auch im Formalin-fixierten Gewebe

fehlte die Herunterregulation des CD95-Rezeptors bei den Nierenzellkarzinomen -verglichen mit nicht-neoplastisch veränderten Tubulusepithelien (Ramp et al., 2003). Bei den Western-Blot-Analysen konnte der CD95-Rezeptor jedoch ausschließlich bei den Karzinomzelllinien nachgewiesen werden. Ein Signal bei den nicht-neoplastischen Tubulusepithelien fehlte (Abb. 3.4).

Im Gegensatz zum hepatozellulären Karzinom entwickelt das Nierenzellkarzinom offenbar keine zusätzliche CD95-abhängige Therapieresistenz während der malignen Entartung. Durch die Expression des Todesrezeptors müsste dieser Tumor eigentlich sensitiver gegenüber einem apoptotischen Reiz reagieren. Da dies nicht der Fall ist, scheint der CD95-abhängige Apoptoseweg defekt zu sein.

Daraufhin wurde die Funktionalität des membrangebundenen Rezeptors überprüft, indem die Nierenkarzinomzelllinien mit dem CD95-stimulierenden Antikörper CH11 behandelt wurden. O'Connell et al. stellten fest, dass die beiden Kolonkarzinomzelllinien HT29 und SW620 keine Apoptose nach einer Stimulation mit CH11 aufwiesen, obwohl sowohl in der RT-PCR als auch in der Durchflußzytometrie der CD95-Rezeptor detektiert wurde (O'Connell et al., 1996), was ebenfalls auf eine funktionelle Störung des CD95-Signaltransduktionsweges hinweisen könnte.

In unseren Untersuchungen ergab sich ein ganz ähnliches Bild. Auch hier zeigte sich bei den meisten Nierenkarzinomzelllinien eine sehr geringe Reaktion auf die Stimulation mit den CH11-Antikörpern. Nur neun von 30 untersuchten Zelllinien konnten als sensitiv angesehen werden (Tabelle 3.1). Dabei gab es keinen Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke des membrangebundenen bzw. löslichen CD95-Rezeptors und der CH11-Sensitivität. Die Mehrzahl der Nierenzellkarzinome zeigten sich trotz Expression des CD95-Rezeptors resistent für die Apoptoseinduktion über den CD95-Weg. Nach CH11-Inkubation ergab sich auch bei den nicht-neoplastischen Nierentubuluszellen eine ähnlich deutliche Apoptoseresistenz wie bei der Mehrzahl der Nierenkarzinomzelllinien (Gerharz et al., 1999).

Als Ursache für die CH11-Resistenz der Kolonkarzinomzelllinien SW620 und HT29 konnte die Arbeitsgruppe um O'Connell den löslichen CD95-Rezeptor und eine zu geringe Expression des CD95-Rezeptors ausschließen (O'Connell et al., 1996). Sie sahen allerdings einen Zusammenhang zwischen der CD95-Ligandenexpression der Kolonkarzinomzelllinie SW620 und der CH11-Resistenz. Hier kam es zu einer Apoptoseinduktion bei CD95-positiven Lymphozyten während der Co-Kultivierung von SW620 (CD95-L positiv) mit der T-Zelllinie Jurkat. Das Wachstum des Kolonkarzinomzellen blieb unbeeinflusst (O'Connell et al., 1996).

Da bei unseren RT-PCR-Analysen der Ligand in Nierenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden konnte, ist eine Abwehr von CD95-positiven Lymphozyten in vivo als Mitursache der Therapieresistenz denkbar, erklärt jedoch nicht die CH11-Resistenz in vitro, ein weiterer Hinweis auf einen funktionellen Defekt des CD95-abhängigen Apoptosewegs.

Auch nach INF- γ -Behandlung, die eine Hochregulation der CD95-Expression bewirken soll (Von Reyher et al, 1998), zeigten sich die meisten Nierenkarzinomzelllinien apoptoseresistent. Die Zellen erfahren jedoch eine Sensitivierung bei der Kostimulation mit INF- γ und CH11 (Gerharz et al., 1999).

Interferon- γ induziert zwar bei Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 und MDA-MB231) eine Hochregulation des CD95-Rezeptors, führt aber auch zu einer deutlichen Steigerung der Caspase-8-Expression (Ruiz-Ruiz et al., 2000). Diese Überexpression der Caspase-8 reicht aus, um die Zellen rezeptorunabhängig in die Apoptose zu treiben (Muzio et al., 1996). Ruiz-Ruiz konnte beim Mammakarzinom auch eine verstärkte Cytochrom-C Freisetzung und Caspase-9 Aktivierung nach INF- γ -Behandlung feststellen (Ruiz-Ruiz et al., 2000), wahrscheinlich getriggert durch das Verbindungsmolekül Bid, welches durch die Caspase-8 Spaltung die Mitochondrien aktiviert (Abb. 1.1). Es bleibt jedoch unklar, weshalb INF- γ alleine bei den Untersuchungen an Nierenkarzinomzelllinien die Apoptose nicht verstärkt induziert.

Nach der Behandlung mit dem Zytostatikum Topotecan (TPT) zeigten drei von vier untersuchten Zelllinien einen zeitabhängigen Anstieg des CD95-Rezeptors und -Liganden. Gleichzeitig konnte eine dosisabhängige, signifikante Steigerung der Apoptose bei diesen Zelllinien beobachtet werden (Ramp et al., 2000). Bei weiteren Untersuchungen wurde der CD95-Rezeptor durch einen antagonistischen Antikörper blockiert. Trotzdem kam es zu einer Abnahme der Zellzahl durch Apoptose nach Topotecan-Behandlung (Ramp et al., 2000). Das CD95-System ist demnach nicht an der Induktion des programmierten Zelltodes in Nierenkarzinomzelllinien beteiligt. Das zeigt auch die Beobachtung an der Zelllinie ClearCa-17, die eine gesteigerte Apoptose nach Topotecan-Behandlung aufweist trotz fehlender Hochregulation des CD95-Rezeptors und -Liganden (Ramp et al., 2000).

Für das Nierenzellkarzinom liegt somit die Vermutung nahe, dass der CD95-Rezeptorstatus der Zellen allein für die Apoptosebereitschaft nicht von entscheidender Bedeutung ist. Weder führte die Stimulation über CH11 zu einer generellen Apoptoseinduktion, noch kann die Apoptose über die Blockade des CD95-Rezeptors inhibiert werden. Erst durch die Kostimulation von CH11 mit $\text{INF-}\gamma$ kam es zu einer Sensitivierung vieler Zelllinien - möglicherweise über eine verstärkte Expression der Caspase-8. Somit könnte ein Defekt in der CD95-abhängigen Apoptosekaskade zwischen dem Rezeptor und der Aktivierung der Caspase-8 eine der Ursachen der Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms sein.

Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit Inhibitionsmechanismen auf dem CD95-abhängigen Apoptoseweg untersucht. Darüber hinaus analysierten wir alternativen Rezeptorsystemen, die den programmierten Zelltod einleiten können.

4.2 Bedeutung des löslichen CD95-Rezeptors in Patientenserum und Zellkulturüberstand

In den bisher durchgeführten Analysen an Nierenkarzinomzelllinien konnte der lösliche CD95-Rezeptor auf mRNA-Ebene nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden.

Nun sollte dieses Ergebnis mit Untersuchungen an Patientenseren verglichen werden. Es wurde bei 12 Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankten, vor der Tumorresektion und 8-15 Tage danach Serum entnommen und der lösliche CD95-Rezeptor mit einem spezifischen ELISA detektiert. Zum Vergleich wurde das Serum von vier gesunden Probanden mit der selben Methode analysiert.

Hierbei zeigte sich keine erhöhte sCD95-Konzentration im Serum von Tumorpatienten, verglichen mit dem gesunden Kollektiv (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Die mittlere Konzentration von 2,48 ng/ml bzw. 2,51 ng/ml ist bei den Patienten vor der Resektion des Nierenzellkarzinoms (2,48 ng/ml) und bei den gesunden Probanden (2,51 ng/ml) nahezu identisch. Im Vergleich dazu konnten bei Leukämien, Ovarial- und Bronchialkarzinom 10- bis 20-fach höhere Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden werden (Midis et al., 1996).

Interessant war die Beobachtung, dass die Konzentration des sCD95-Rezeptors 8-15 Tage nach der Operation in allen Proben höher lag als vor dem Eingriff (Tabelle 3.4). Da der Tumor zu diesem Zeitpunkt bereits rezidiert war, konnten diese erhöhten Werte nicht karzinomspezifisch sein.

Die Frage nach der Herkunft der erhöhten sCD95-Konzentration ist bislang nicht eindeutig zu beantworten. Eine mögliche Erklärung bietet die Aktivierung des Immunsystems durch den operativen Eingriff. Zytokine wie TNF- α und INF- γ induzieren bei einer entzündlichen Reaktion, wie sie postoperativ auftritt, die Hochregulation des CD95-Rezeptors und seiner Spleißformen (Leithäuser et al., 1993).

Wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, kann der lösliche CD95-Rezeptor nicht alleine für die Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms verantwortlich sein. Er stellt jedoch einen wichtigen Faktor bei der Vielzahl möglicher Apoptose-Resistenzmechanismen dar.

4.3 Die Bedeutung von LARD und dessen Spleißformen im Nierenzellkarzinom

LARD ist ein neueres Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, das durch Bindung des Liganden Apo3L die Apoptose über die Caspasen-Kaskade auslösen

kann (Marsters et al, 1996 u. 1998; Bodmer et al., 1997). Er wird als Alternative bei defektem oder inaktivem CD95-System interessant, da hierdurch weiterhin die Apoptoseinduktion gewährleistet wird. Die bisherigen Untersuchungen von LARD, der auch Todesrezeptor 3 (DR3) genannt wird, haben sich auf lymphatisches Gewebe, Lymphozyten und Leukämien konzentriert.

Bei unseren Expressionsanalysen konnte LARD erstmalig beim humanen Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden. Die LARD Expression beschränkt sich demnach nicht auf das lymphatische System bzw. auf lymphozytenreiches Gewebe wie Thymus und Milz, wie anfangs postuliert wurde (Screaton et al., 1997; Bodmer et al., 1997).

Da LARD durch alternatives Spleißen eine Vielzahl von Varianten aufweist, haben wir durch eine PCR-Analyse die Expression Apoptose-induzierender und -inhibierender Formen gegenübergestellt und densitometrisch bestimmt. Hierzu wählten wir eine Primerkombination, welche die ersten drei Spleißformen dieses Todesrezeptors detektiert. LARD1 repräsentiert den aktiven proapoptotischen Rezeptor, während LARD2 und LARD3 lösliche Formen darstellen, denen sowohl die Transmembranregion, als auch die zytoplasmatische Domäne fehlen (Screaton et al., 1997). Sie könnten als sekretorische Rezeptoren den Liganden Apo3L kompetitiv binden, ohne das Apoptosesignal an die Zelle weiterzuleiten und so als sog. Decoy-Rezeptoren einen effektiven Apoptose-Resistenzmechanismus darstellen (Screaton et al., 1997).

Wie in Abb. 3.6. zu erkennen ist, gab es zwischen den Zelllinien erhebliche Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Spleißvarianten. Zumeist überwog LARD1 als Apoptose-induzierender Rezeptor, mit Ausnahme der Zelllinien ClearCa-1. Bei einer Kombination der beiden löslichen Varianten LARD2 und LARD3 dominierten bei 3 weiteren Zelllinien die Inhibitoren des programmierten Zelltodes. Insgesamt fiel eine erhebliche Expressionsvielfalt aller drei Spleißformen auf.

Da die Expression von LARD bei transformierten Lymphozytenzelllinien herunterreguliert wurde, bestand der Verdacht, dass der Verlust von LARD bei der Entwicklung von lymphatischen Malignomen entscheidend beteiligt ist (Screaton et al., 1997). Für das Nierenzellkarzinom trifft diese Vermutung

nach unseren Ergebnissen jedoch nicht zu. In der RT-PCR konnte sowohl in den Karzinomzelllinien, als auch in den Kurzzeitkulturen nicht-neoplastischer Tubulusepithelien LARD nachgewiesen werden.

Sowohl Warzocha als auch Screatton stellten fest, dass unstimulierte B- und T-Lymphozyten vermehrt die Spleißformen exprimierten im Gegensatz zu stimulierten Lymphozyten, bei denen LARD1 dominierte (Warzocha et al., 1998; Screatton et al., 1997). Bezogen auf den Differenzierungsgrad der Tumorzellen konnte kein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke der Spleißformen und dem Differenzierungsgrad gesehen werden.

Wie bereits für das CD95-System gezeigt werden konnte, steht dem Nierenzellkarzinom mit den löslichen Rezeptoren LARD2 und LARD3 zwei weitere Apoptose-Inhibitionsmechanismen zur Verfügung. Aufgrund des Expressionsverhältnisses zwischen dem membranständigen und den löslichen Rezeptoren ist jedoch eine alleinige effektive Inhibition durch das LARD-System unwahrscheinlich. Die Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms scheint nicht ausschließlich auf der Rezeptorebene begründet zu sein. Auch intrazellulären Modulatoren der Apoptose können entscheidend zu der ausgesprochenen Resistenzlage des Nierenzellkarzinoms beitragen.

4.4 Die Bedeutung von Osteoprotegerin (OPG) im Nierenzellkarzinom

Eine Alternative zum bisher untersuchten CD95- und LARD-System stellt das TRAIL-System mit seinem lösliche Rezeptor OPG dar.

Während die Bindung des TRAIL-Liganden an die membranständigen Todesrezeptoren DR4 und DR5 zur Apoptose führt (Pan, et al., 1997; Sheridan et al., 1997), kann die Interaktion von TRAIL mit OPG den Zelltod inhibieren, da OPG als Decoy-Rezeptor in löslicher Form den TRAIL-Liganden vor dessen Bindung mit DR4 und DR5 abfangen kann.

Bisherige Untersuchungen von TRAIL ergaben, dass es sich hierbei um einen ubiquitär exprimierten Liganden handelt, der besonders bei der Apoptoseinduktion in aktivierten Lymphozyten eine Rolle spielt (Pitti et al., 1996). Darüber hinaus konnte die Apoptose durch TRAIL auch in

Tumorzelllinien eingeleitet werden, wie z. B. bei den Zervixkarzinomzelllinien HeLa sowie ME180 und bei der Bronchialkarzinomzelllinie A549. Hier zeigte sich sogar eine höhere Apoptose-Sensitivität bei der Exposition mit TRAIL im Vergleich zum CD95-Liganden (Pitti et al., 1996).

Interessanterweise reagierte die fetale Nierenkarzinomzelllinie 293T auf TRAIL nur mit einer sehr schwachen Apoptoseinduktion (Pitti et al., 1996).

Die Untersuchungen unserer Nierenkarzinomzelllinien zeigten, dass die mRNA von OPG eine sehr heterogene Expressionsstärke aufwies, welche von kaum erkennbaren bis zu sehr deutlichen Signalen reichte (Abb. 3.8). Ein Zusammenhang zwischen der Signalstärke und dem Tumor-Typ, -Stadium oder -Differenzierungsgrad ist nicht ersichtlich.

Auch der Vergleich mit der mRNA-Expression von TRAIL, die uns durch einen anderen Teil der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen, zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. Lediglich die beiden Zelllinien ClearCa-1 und Chromphi-1 zeigten eine starke OPG-Expression und nur ein schwaches TRAIL-Signal im RPA (**RNase Protection Assay**), was auf eine möglicherweise effektive Apoptose-Inhibition hindeuten könnte (Déjosez et al., 2000). Ein Blick auf die basale Apoptoserate (BAD) zeigte jedoch, dass ClearCa-1 eine relativ hohe BAD, und Chromphi-1 eine mittlere BAD aufwiesen (Tabelle 3.1).

Analog dazu zeigten Zelllinien mit einer starken TRAIL- und einer schwachen OPG-Expression (ClearCa-4, -9, -17 und Chromphi-3) ebenfalls eine sehr uneinheitliche BAD von 0,2 bis 3,7 (Tabelle 3.1). Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Expressionsstärke von OPG/TRAIL und der allgemeinen Apoptosesensitivität der Tumorzelllinien ergaben sich somit nicht.

Daten der spezifischen Apoptosesensitivität der Tumorzelllinien gegenüber einem rekombinanten humanen löslichen TRAIL-Rezeptor (rhsTRAIL) zeigten ein ungleichmäßiges Reaktionsprofil. Hier konnte bei 10 von 16 Zelllinien ein deutliches Ansprechen auf den apoptotischen Reiz gesehen werden. Es bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen der Apoptosesensitivität und der TRAIL-bzw. OPG-Expression. Eine besonders geringes Ansprechen auf rhsTRAIL zeigten die Zelllinien ClearCa-4, -9, -26 und Chromphi-3 mit Proliferationsraten von 87-99% (Déjosez et al., 2000). Im

Vergleich hierzu ist OPG bei drei dieser Zelllinien kaum nachweisbar (Clear-Ca -4, -9 und Chromphi-3).

Obwohl OPG nicht der entscheidende Apoptose-Inhibitionsfaktor des Nierenzellkarzinoms ist, sollte er im Hinblick auf die Variationsbreite der möglichen Apoptoseinhibitoren neben sCD95, LARD2 und LARD3 nicht vernachlässigt werden.

4.5 Nachweis der Caspase-8 im Nierenzellkarzinom als zentrale Komponente der Apoptosesignal-Kaskade

Die Analyse der Todesrezeptoren im Nierenzellkarzinom zeigte, dass nicht ein einzelner Faktor für die Apoptoseresistenz des Nierenzellkarzinoms verantwortlich ist. Vielmehr ist das komplexe Zusammenspiel der Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren und deren Inhibitoren von entscheidender Bedeutung. Die Entscheidung über das Überleben einer Zelle oder deren Untergang kann jedoch nicht nur auf Rezeptorebene getroffen werden. Auch auf dem weiteren Signaltransduktionsweg gibt es eine Vielzahl von Modulationsmöglichkeiten.

Hier ist besonders die Caspase-8 zu erwähnen. Diese Initiator-Caspase ist beispielsweise bei der Apoptoseinduktion durch CD95 und TRAIL von zentraler Bedeutung (Abb. 1.1). Nach der Aktivierung von Adaptermolekülen durch die Todesrezeptoren wird zunächst die Caspase-8 durch proteolytische Spaltung in den aktiven Zustand überführt (Boldin et al., 1996; Medema et al., 1997). Daraufhin wird eine ganze Caspasen-Kaskade aktiviert, die letztendlich den apoptotischen Untergang der Zelle zur Folge hat (Fernandes-Alnemri et al., 1996). Eine Inhibition dieser Caspase und der nachfolgenden Kaskade stellt demnach einen wirkungsvollen Apoptose-inhibierenden Mechanismus an einer zentralen Stelle des Signaltransduktionsweges dar.

Bei unseren Analysen konnte die Caspase-8 durch Western-Blot-Untersuchungen in allen untersuchten Zelllinien des Nierenzellkarzinoms detektiert werden. Hierbei kamen die beide aktiven Formen, Caspase-8a und

8b zur Darstellung (Abb. 3.9). Allerdings sind die Signalstärken in den einzelnen Zelllinien sehr unterschiedlich.

Die Expressionsstärke der Caspase-8 in den einzelnen Nierenkarzinomzelllinien steht jedoch in keinem Zusammenhang mit der CD95-Sensitivität. Dies machen Studien zur Funktionalität des CD95-Systems deutlich. Nach der Stimulation des CD95-Signaltransduktionsweges durch den agonistischen Antikörper CH11 zeigten sich unter anderem die Zelllinien ClearCa-3, -6 und -17 sensitiv mit einer spezifischen Apoptoserate (SAD) von 8 - 32% (Tabelle 3.1). Wie in Abb. 3.9 zu erkennen ist, besitzen die Zelllinien ClearCa-3 und -6 relativ hohe Caspase-8 Proteinmengen. Im Gegensatz dazu zeigt ClearCa-17 ein mittelstarkes Signal. Andererseits hat ClearCa-15 mit einer der stärksten Caspase-8-Signale eine der schwächsten Sensitivitäten auf die CD95-induzierte Apoptose mit einer SAD von 0,1%.

Auch im Vergleich mit der TRAIL-Sensitivität lässt sich keine Korrelation zu der Caspase-8 Expression herstellen. Hier waren insbesondere die TRAIL-resistenten Zelllinien ClearCa-6, -11 und -17 zu betrachten, welche im Western-Blot mittlere bis starke Caspase-8-Signale zeigten. Die Resistenzlage der Zelllinien scheint in keinem Zusammenhang mit der Expressionsstärke von Caspase-8 zu stehen, deutet aber auf einen funktionellen Defekt im Signaltransduktionsweg hin.

Die fehlende Sensitivierung der Nierenkarzinomzelllinien durch IFN- γ , das die Caspase-8 Expression steigert (Ruiz-Ruiz et al, 2000), könnte ebenfalls einen Hinweis auf einen gestörten Caspase-8-Signalweg geben. Dabei ist an FLIP_L zu denken, das durch Bindung an die Prodomäne die Caspase-8 Spaltung verhindern kann. Dieser Inhibitionsmechanismus konnte für die Apoptoseinduktion über CD95 in T-Lymphozyten nachgewiesen werden, nicht jedoch für eine Zytostatika-induzierte Apoptose (Kataoka et al., 1998). FLIP stellt also einen interessanten Modulator des programmierten Zelltodes dar, dessen Bedeutung für das Nierenzellkarzinom nun eingehender betrachtet wird.

4.6 Die Bedeutung der Apoptoseinhibitoren FLIP_S und FLIP_L im Nierenzellkarzinom

Die beiden Apoptose-inhibierenden Proteine FLIP_S und FLIP_L können die Interaktion von FADD mit Caspase-8 und möglicherweise auch mit Caspase-10 am DISC verhindern (Kataoka et al., 1998). Hierdurch wird die gesamte Caspasen-Kaskade jenseits der Caspase-8 inhibiert (Irmmler et al., 1997, Scaffidi et al., 1998). Wie bereits zuvor beschrieben, wird die Caspase-8 durch das CD95- und das TRAIL-System aktiviert (Boldin et al., 1996; Pan, et al., 1997; Sheridan et al., 1997).

FLIP wurde zunächst bei Viren, später auch als Spleißformen FLIP_L und FLIP_S in humanen Zellen gefunden (Irmmler et al., 1997). Da sich Viren nur mit Hilfe einer Wirtszelle reproduzieren können, haben sie Mechanismen entwickelt, um den Tod dieser infizierten Zellen zu verhindern, indem der programmierte Zelltod, den die Wirtszelle zum Schutz des Gesamtorganismus eingeht, inhibiert wird (Thome et al., 1997). Gelingt es nicht, das Virus unschädlich zu machen, kann im schlimmsten Fall die maligne Transformation der Wirtszellen induziert werden, wie am Beispiel des Epstein-Barr-Virus gezeigt werden konnte (Tepper et al., 1999).

FLIP nimmt bei der Inhibition des CD95-induzierten Apoptosewegs eine zentrale Rolle ein (Kataoka et al., 1998). Die Effektivität der Apoptose-Inhibition korreliert mit dem Verhältnis Caspase-8 zu FLIP (Tepper et al., 1999). Auch Scaffidi konnte zeigen, dass eine Apoptose-Inhibition nur erfolgt, wenn FLIP in einer mindestens 100fachen Konzentration im Vergleich zu Caspase-8 vorhanden ist (Scaffidi et al., 1998).

Bei unseren Untersuchungen konnten auf mRNA-Ebene beide Spleißformen nachgewiesen werden. Für FLIP_S zeigte sich ein sehr homogenes Expressionsmuster, während die Signale für FLIP_L schwächer und inhomogener waren. Eine wichtige Komponente für die Apoptoseresistenz über das CD95- und das TRAIL-System ist im Nierenzellkarzinom demnach potentiell vorhanden.

Da FLIP_L die CD95-induzierte Apoptose besonders effektiv inhibieren soll (Irmmler et al., 1997), war ein Vergleich zwischen spezifischer CH11-

induzierten Apoptoserate (SAD) und dem FLIP_L-Expressionsniveau angebracht.

Hierbei zeigten die beiden Zelllinien mit besonders geringer FLIP_L Expression (ClearCa-4 und -6) eine SAD von 0,9 bzw. 32,1. ClearCa-6 (SAD: 32,1) zählte zu einer der sensitivsten Zelllinien gegenüber CH11 in dieser Versuchsreihe, während ClearCa-4 CH11 resistent war.

Aber auch Zelllinien mit einem hohen FLIP_L-Expressionsniveau zeigten sich sowohl resistent, als auch sensibel gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose. Die Sensitivität des Nierenzellkarzinoms gegenüber CH11 stand also in keinem direkten Zusammenhang mit der FLIP_L-Expression. Die Nierenzellkarzinome zeigten jedoch eine völlig andere Reaktion als die T-Zellen der Arbeitsgruppe um Kataoka, die eine effektive Apoptose-Inhibition durch FLIP auf die CD95-Liganden induzierte Apoptose verzeichneten (Kataoka et al., 1998).

FLIP_S dagegen ist ein stärkerer Inhibitor der TRAIL-induzierten Apoptose (Irmmler et al., 1997). Untersuchungen zum Apoptoseverhalten der Nierenzelllinien bei Aktivierung des TRAIL-Systems zeigten ein heterogenes Muster, bei dem sechs von 16 Zelllinien als resistent und alle übrigen als sensitiv eingestuft wurden (Déjosez et al., 2000). Diese Reaktionsunterschiede können nicht unmittelbar mit der Existenz des Caspase-Inhibitors erklärt werden, da FLIP_S in der RT-PCR ein einheitliches Expressionsmuster aufwies.

Die unterschiedlichen Präferenzen von FLIP_L und FLIP_S bezüglich der Apoptose-Inhibition über CD95 und TRAIL, wie sie von Kataoka und Irmmler gefunden wurden, sind möglicherweise mit den unterschiedlichen Gewebetypen (T-Lymphozyten bzw. embryonale Nierenzelllinien 293T) zu erklären. Bezogen auf das Nierenzellkarzinom lässt sich jedoch weder eine Korrelation der CD95-induzierten Apoptoserate mit FLIP_L, noch mit FLIP_S nachweisen.

Kataoka et al. entdeckten bei Jurkat-Zelllinie, dass FLIP nicht nur Einfluss auf den Rezeptor-abhängigen Apoptoseweg hat, sondern auch bei der Aktivierung von NF-κB mitwirkt, und so die Induktion des Wachstumsfaktors Interleukin-2 initiiert (Kataoka et al., 2000). Durch die verstärkte Expression

von FLIP, die in einigen Karzinomen nachgewiesen werden konnte, wird demnach nicht nur der apoptotische Zelltod verhindert, sondern ein Zellwachstum aktiv gefördert (Kataoka et al., 2000).

Darüber hinaus scheint der CD95-Ligand die Rekrutierung von FLIP an den DISC zu induzieren, und somit die Apoptose über den CD95-Signalweg zusätzlich zu inhibieren (Kataoka et al., 2000). Da der CD95-Ligand in unseren Zelllinien nachgewiesen werden konnte, ist dieser Mechanismus auch beim Nierenzellkarzinom denkbar.

FLIP ist also als zentraler Apoptose-Inhibitionsfaktor im Nierenzellkarzinom zu sehen, wenngleich er als Einzelfaktor die Therapieresistenz nicht hinreichend erklären kann.

4.7 Die Bedeutung von Caspase-9 und der Spleißform Caspase 9s im Nierenzellkarzinom

Im folgenden wird ein weiterer wichtiger Faktor der Caspasen-Kaskade im Hinblick auf seine apoptotische Relevanz im Nierenzellkarzinom diskutiert.

Die Caspase-9 hebt sich dadurch hervor, dass sie auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert werden kann.

Zum einen kann eine Mitochondrienaktivierung rezeptorunabhängig über eine CytochromC-Ausschüttung und Caspase-9-Spaltung erfolgen. Als Induktoren dieses Weges sind Bestrahlung, Zytostatika und der Entzug von Viabilitätsfaktoren beschrieben worden (Ochs et al., 2000).

Außerdem spielt die Caspase-9 eine zentrale Rolle bei der Todesrezeptor-induzierten Apoptose über CD95, TRAIL, LARD und TNFR-1 (Seol et al., 1999).

Die Veränderung von Caspase-9 durch alternatives Spleißen, so dass die katalytisch inaktive dominant negative Caspase-9s entsteht, kann folglich einen Großteil der bisher bekannten Apoptosewege inhibieren (Seol et al., 1999).

Alle untersuchten Zelllinien wiesen bei unsere Analysen in der RT-PCR ein Signal für die Caspase-9 und die Spleißform Caspase-9s. Dabei zeigte die vollständige, Apoptose-induzierende Spleißform in den meisten Fällen eine stärkere Expression. Eine Ausnahme stellten die beiden Zelllinien ClearCa-1

und ClearCa-4 dar, bei denen nur die Caspase-9s detektiert werden konnte. Die basale Apoptoserate dieser beiden Zelllinien ist mit 2,2% bzw. 1,1% jedoch eher im oberen Bereich anzusiedeln. Der fehlende Nachweis der Caspase-9 auf mRNA-Ebene hat demnach keinen Inhibition der basalen Apoptose zur Folge.

Nach Inkubation mit CH11 und/oder INF- γ blieb ClearCa-1 resistent. Die Zelllinien ClearCa-4 zählte nach CH11 und INF- γ -Behandlung zwar zu den sensitiven Zellen, hatte jedoch weiterhin eine eher geringe spezifische Apoptoserate mit 4,5%. Möglicherweise ist die Apoptosekaskade nach CD95-Stimulation bei diesen beiden Zelllinien durch das Fehlen der Caspase-9 gestört.

In allen übrigen Zelllinien ist eine kompetitive Wirkung zwischen der aktiven und der inhibitorischen Form der Caspase-9 denkbar. Hierbei ist zu beachten, dass schon ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einem Caspase-9- und Caspase-9s-Molekül, die proteolytische Aktivität vollständig inhibieren kann (Seol et al., 1999).

Somit ist Caspase-9s ein weiteres Steinchen im Mosaik der Apoptose-Inhibitionsmechanismen, das dem Nierenzellkarzinomen zur Verfügung stehen.

Unabhängig von dem Nachweis des negativ dominanten Spleißform Caspase-9s konnte später gezeigt werden dass es bei den Nierenzellkarzinomen nach Bestrahlung und/oder TRAIL-Exposition die Aktivierung von Caspase-9 ausblieb. Dies steht eventuell in Zusammenhang mit der fehlenden Vernetzung der Caspase-8 mit der Caspase-9 über Bid. Es konnten keine Bid-Spaltprodukte nach Bestrahlung und/oder TRAIL-Exposition nachgewiesen werden, obwohl eine deutlichen Aktivierung der Caspase-8 gemessen wurde.

Darüber hinaus fiel sowohl eine hohe XIAP-Konzentration, als auch eine starke Expression von XIAP-Spaltprodukte auf, die die Aktivierung der Caspase-9 und darüber hinaus auch die Effektor-Caspasen-3 und -7 inhibieren können (Ramp et al., 2003). XIAP gehört zu der Familie der Apoptoseinhibitoren IAP (Inhibitor of **A**poptosis).

XIAP konnte 2004 erstmals als prognostischer Marker für das klarzellige humane Nierenzellkarzinom identifiziert werden. Eine geringe XIAP-Expression korreliert mit einer guten Differenzierung des Primärtumors (G1) und einer besseren Prognose des Patienten. Andererseits zeigten Patienten mit einem gering differenzierten Tumor (G3) und einer schlechteren Überlebensrate eine hohe XIAP-Expression (Ramp et al., 2004).

Die Untersuchungen machen deutlich, dass die Caspase-9 und deren Inhibition im Zentrum der Apoptoseresistenz des Nierenzellkarzinoms steht.

5 Zusammenfassung

Die Resistenz von Tumoren gegenüber einer Chemotherapie und/oder einer Bestrahlung stellt ein großes Problem in der onkologischen Therapie dar. Eine Ursache können Inhibitionsmechanismen der Apoptose sein. In dieser Arbeit wurden einige zentrale Faktoren des programmierten Zelltodes am Beispiel des ausgesprochen therapierefraktären Nierenzellkarzinoms untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Grundcharakterisierung von möglichen Apoptose-Inhibitionsfaktoren gelegt und deren Expression mit gesundem Gewebe verglichen. Darüber hinaus wurden funktionellen Studien hinzugezogen, um eine Einschätzung über die Bedeutung der einzelnen Faktoren im Nierenzellkarzinom zu erhalten.

Zunächst analysierten wir einige Todesrezeptoren der TNF-Familie, die bekannterweise durch Zytostatika aktiviert werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Nierenzellkarzinome die Rezeptoren CD95 und LARD exprimieren. Bei beiden wurden lösliche Spleißformen gefunden, die als sog. Decoy-Rezeptoren den jeweiligen Liganden (CD95-L bzw. Apo3L) kompetitiv binden können, um so die Apoptose zu inhibieren.

Funktionellen Studien deuten darauf hin, dass die Apoptoseresistenz von Nierenzellkarzinomen nicht allein auf die Modulation auf Rezeptorebene zurückzuführen ist. Hierbei wurde beispielsweise die Reaktion der Nierenkarzinomzelllinien auf die Stimulation mit dem CD95-Induktor CH11 und Interferon- γ untersucht. Ein Zusammenhang zwischen der Sensitivitätslage der Zelllinien und dem Expressionsstatus von CD95 und CD95-L konnte nicht ermittelt werden. Es war jedoch auffällig, dass ein Grossteil der Zelllinien primär resistent gegenüber einer CH11-induzierten Apoptose waren. Diese Beobachtung lässt auf einen funktionellen Defekt des CD95-abhängigen Apoptosewegs im Nierenzellkarzinom schließen. Bei der Kostimulation mit CH11 und Interferon- γ konnte die Apoptoseresistenz bei 22 der 30 untersuchten Zelllinien überwunden werden. Da IFN- γ zu einer Überexpression von Caspase-8 führt, könnte der Todesrezeptor-abhängige Weg umgangen werden. Unklar blieb jedoch, warum die alleinige Exposition mit Interferon- γ keine verstärkte Apoptose induzierte.

Im weiteren Verlauf wurde die Caspasen-Kaskade näher analysiert. Speziell Caspase-Inhibitoren sind sehr interessant, da sie an zentralen Punkten des Signalweges angreifen, wie beispielsweise FLIP als Caspase-8 Inhibitor und die Spleißform Caspase-9s. Dabei konnten diese Apoptose-inhibierenden Modulatoren in allen Nierenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden.

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Apoptoseresistenz und damit Chemotherapieresistenz des Nierenzellkarzinoms nicht auf einem einzelnen Faktor beruht. Vielmehr ist das Zusammenspiel vieler Modulatoren wahrscheinlich, die an verschiedenen Punkten der Signalkaskade angreifen.

6

Literaturverzeichnis:

- Banner, D.W.,** D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H-J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W.: Crystal Structure of the Soluble Human 55 kd TNF-Receptor-Human TNF β Complex: Implications for TNF Receptor Activation. 1993 *Cell* 73, 431-445.
- Binder, C.,** Wörmann, B.: Apoptose- Regulator der Gewebekomöostase. 1996 *Onkologie* 2: 82-86.
- Bodmer, J-L.,** Burns, K., Schneider, P. Hofman, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schröter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L. E., Browning, J. L., MacDonald, H. R., Tschopp, J.: TRAMP, a Novel Apoptosis-Mediating Receptor with Sequence Homology to Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). 1998 *Immunity* 6, 79-88.
- Boldin, M. P.,** Goncharov, T. M., Goltesv, Y. V.und Wallach, D.: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in a Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. 1996 *Cell* 85, 803-815.
- Bossy-Wetzel, E.,** Newmeyer, D.D., Green, D.R.: Mitochondrial cytochrom c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independent of mitochondrial transmembrane depolarization. 1998 *EMBO* 17 (1), 37-49.
- Cascino, I,;** Fiucci, G., Papoff, G., Ruberti, G.: Three Functional Soluble Forms of the Human Apoptosis-Inducing Fas Molecule Are Produced by Alternative Splicing. 1995 *Journal of immunology* 154, 2706-2713.
- Cheng, J.,** Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M., Kiefer, M. C., Barr, P. J. und Mountz, J. D.: Protection from Fas-Mediated Apoptosis by a Soluble Form of the Fas Molecule. 1994 *Science* 263, 1759-1762.
- Collecchi, P.,** Baldini, E., Giannessi, P., Naccarato, A. G., Passoni, A., Gardin, G., Roncella, A., Evangelista, G., Bevilacqua, G., Conte, P. F: Primary Chemotherapy in Locally Advanced Breast Cancer (LABC): Effects on Tumour Proliferative Activity, bcl-2 Expression and the Relationship Between Tumour Regression and Biological Markers. 1998 *Europ J. Cancer* 34 (11), 1701-1704.

Collins, R. J., Harmon, B. V., Souvlis, T., Pope, J. H., Kerr, J. F.: Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. 1991 *Br. J. Cancer* 64, 518-522.

Déjosez, M., Ramp, U., Mahotka, C., Krieg, A., Walczak, H., Gabbert, H.E., Gerharz, C.D.: Sensitivity to TRAIL/ APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. 2000 *Cell Death Diff. Nov*, 7(11):1127-1136.

Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G., Froelich, C., He, W., Dixit, V.: ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T-cell protease granzyme B. 1996 *J. Biol. Chem.* 271 (28) 16720-16724

Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, D. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J. C., Young, P. R.: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. 1998 *J. Biol. Chem.* 273 (23) 14363-13367.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, A.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., Alnemri, E.S.: In vivo activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 7464-7469.

Fisher, D. E.: Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Threshold. 1994 *Cell.* 78, 539-542.

Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., Debatin, K.M.: The CD95 (APO-1/Fas) System Mediates Drug-induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells. 1997 *Cancer Research* 57, 3823-3829.

Gerharz, C.D., Ramp, U., Olert, J., Moll, R, Störkel, S, Marx, N., Gabbert, H.E.: Cytomorphological, cytogenetic and molecular biological characterization of four new human renal cell carcinoma cell lines of the clear cell type. *Virchows Arch.*, 424, 403-409, 1994.

Gerharz, C.D., Moll, R, Störkel, S., Ramp, U., Hildebrandt, B., Molsberger, G., Koldovsky, P., Gabbert, H.E.: Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe carcinoma. *Am. J. Pathol.* 146, 237-244, 1995

Gerharz, C.D., Hildebrandt, B., Moll, R., Ramp, U., Sarbia, M., Störkel, S., Koldovsky, P., Gabbert, H.E.: Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterization of four permanent cell lines. *Brit. J. Cancer* (1996) 74, 1605-1614.

Gerharz, C.D., Ramp, U., Déjosez, M., Mahotka, C., Czarnotta, B., Bretschneider, U., Lorenz, I., Müller, M., Krammer, P.H.: Resistance to CD95 (APO-1/Fas)-Mediated Apoptosis in Human Renal Cell Carcinomas: An Important Factor for Evasion from Negative Growth Control. 1999 *Lab. Invest* 79 (12), 1-13.

Germann, U.A.: P-glycoprotein- A Mediator of Multidrug Resistance in Tumour Cells. 1996 *Europ. J. Cancer* 32A (6), 927-944.

Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A.: Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege. 1995 *Science* 270, 1189-1192

Hadano, S., Nasir, J., Nichol, K., Rasper, D., Vaillancourt, J., Sherer, S., Beatty, B., Ikeda, J., Nicholson, D., Hayden, M.: Genomic organization of the human caspase-9 gene on Chromosom 1p36.1-p36.3. 1999 *Mammalian Genome* 10, 757-760

Holmström, T.H., Schmitz, I., Söderström, T.S., Poukkula, M., Johnson, V.L., Chow, S.C., Krammer, P.H., Eriksson, J.E.: MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. 2000 *EMBO* 19 (20), 5418-5428.

Horie, S., Kano, M., Higashihara, E., Moriyama, N., Tanaka, E., Hirose, A., Kakizoe, T., Kawabe, K.: Expression of Fas in Renal Cell Carcinoma. 1997 *Jpn J Clin Oncol*; 27 (6) 384-388.

Hu, S., Vincenz, J., Ni, R., Gentz, D., Dixit, V. M.: I-FLICE, a Novel Inhibitor of Tumor Necrosis Factor Receptor-1 and CD95-induced Apoptosis. 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 17255-17257

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.-L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al.: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. 1997 *Nature* 388, 190-195.

Itho, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. und Nagata, S.: The polypeptide encoded by the cDNA

for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. 1991 *Cell* 66, 233-243.

Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., Tschopp, J.: FLIP Prevents Apoptosis Induced by Death Receptors But Not by Perforin/Granzyme B, Chemotherapeutic Drugs and Gamma Irradiation. 1998 *J. Immunol* 161, 3936-3942.

Kataoka, T., Budd, R.C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsics, M., Tschopp, J.: The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. 2000 *Curr Biol* 10, 640-8.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. 1972 *Br. J. Cancer* 26, 239-257

Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V.: Apoptosis: Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. 1994 *Cancer* 73 (8), 2013-2026.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing-signaling-complex (DISC) with the receptor. 1995 *EMBO J.* 14, 5579-5588.

Krammer, P.H.: Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord. 1997 *Onkologie* 20, 239-243

Leithäuser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bröderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K-M., Krammer, P.H., Möller, P.: Constitutive and Induced Expression of APO-1, A New Member of the Nerve Growth Factor/Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, In Normal and Neoplastic Cells. 1993 *Lab. Invest.* 69 (4), 415-429.

Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J.: Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. 1998 *Cell* 94, 491-501.

Liu, D., Martino, G., Thangaraju, M., Sharma, M., Halwani, F., Shen, S-H., Patel, Y.C., Srinikant, C. B.: Caspase-8-mediated Intracellular Acidification Precedes Mitochondrial Dysfunction in Somatostatin-induced Apoptosis. 2000 *J. Biol. Chem.* 275, 9244-9250.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.: Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. 1998 *Cell* 94, 481-490.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Donahue, C. J., Pitti, R. M., Gray, C. L., Goddar, A. D., Bauer, K. D., Ashkenazi, A.: Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF- κ B. 1996 *Curr. Biol.* 6, 1667-1676.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A. D., Ashkenazi, A.: Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. 1998 *Curr. Biol.* 8, 525-528.

Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C, Shevchenko, A. Mann, M., Krammer, P. H. und Peter, M. E.: FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex (DISC). 1997 *EMBO* 16 (10) 2794-2804.

Mickisch, G.H. Nierenzellkarzinom: Welcher Patient benötigt Immuntherapie? 1998 *Urologe B*, 38, 27-30.

Midis, G.P., Shen, Y., Owen-Schaub, L.B.: Elevated Soluble Fas (sFas) Levels in Nonhematopoietic Human Malignancy. 1996 *Cancer Research* 56, 3870-3874.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Dixit V.M. et al.: FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex. 1996 *Cell* 85, 817-827.

Muzio, M., Salvesen, G.S., Dixit, V.M.: FLICE Induced Apoptosis is a Cell-free System. 1997 *J. Biol. Chem.* 272 (5) 2952-2956.

Nagata, S.: Apoptosis by death factors. 1997 *Cell* 88, 355-365.

Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., Sakai, K.: Protein expression and funktional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. 2000 *Biochem Biophys Res Commun* 7, 275 (3), 768-75.

Newton, C. R., Graham, A.: PCR. 1994 *Spektum Verlag*, ISBN 3-8274-0190-

Ochs, K., Kaina, B.: Apoptosis Induced by DNA Damage O⁶-Methylguanine Is Bcl-2 and Caspase-9/3 Regulated and Fas/Caspase-8 Independent. 2000 *Cancer Research* 60, 5815-5824.

O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., Shanahan, F.: The Fas Counterattack: Fas-mediated T Cell Killing by Colon Cancer Cells Expressing Fas Ligand. 1996 *J. Exp. Med.* 184, 1075-1082

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G. Klas, C., Li Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., Ponsting H., Krammer, P.H.: Purifikation and Molekular Cloning of the APO-1 Cell Surface Antigen, a Member of the Tumor Necrosis Factor/ Nerve Growth Factor Receptor Superfamily. 1992 *J. Biol. Chem.* 267, 10709-10715.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.: The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. 1997 *Science* 276, 111-113.

Pan, G., Ni, J., Wie, Y-F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V. M.: An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL. 1997 *Science* 277, 815-817.

Pitti, R.M., Marstern, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A.: Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytocine Family. 1996, *J. Biol. Chem.* 271 (22), 12687-12690

Ramp, U., Bretschneider, U., Ebert, T., Karagiannidis, C., Willers, R., Gabbert, HE., Gerharz, CD.: Prognostic Implications of CD95 Receptor Expression in Clear Cell Renal Carcinomas. 2003 *Hum. Pathol. Feb*;34(2):174-9

Ramp, U ., Dejosez, M., Mahotka, C., Czarnotta, B., Kalinski,T., Wenzel,M., Lorenz, I., Müller, M., Krammer, P., Gabbert, HE., Gerharz, CD.: Deficient activation of CD95 (APO-1/FAS)-mediated apoptosis: a porential factor for multidrug resistance in human renal cell carcinoma. 2000 *Brit. J. Cancer.* 82(11), 1851-1859

Ramp, U., Caliskan, E., Mahotka, C., Krieg, A., Heikhaus, S., Gabbert, HE., Gerharz, CD.: Apoptosis in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. 2003 *Br. J. Cancer* 88(11):1800-7.

Ramp, U., Krieg, T., Caliskan, E., Mahotka, C., Ebert, T., Willers, R., Gabbert, HE., Gerharz, CD.: XIAP Expression Is an Independent Prognostic Marker in Clear-Cell Renal Carcinomas. 2004 *Hum. Pathol Aug*;35(8):1022-1028.

Ruiz-Ruiz, C., Mundo-Pinedo, C., López-Rivas, A.: Interferon- γ Treatment Elevates Caspase-8 Expression and Sensitizes Human Breast Tumor Cells to a Death Receptor-induced Mitochondria-operated Apoptotic Program. 2000 *Cancer Research* 60, 5673-5680.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977 *Proc. Natl. Acad. Science USA* 74 (12), 5463-5467.

Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H., Peter, M.E.: FLICE Is Predominantly Expressed as Two Funktionally Active Isoforms, Caspase-8/a and Caspase-8/b. 1997 *J. Biol. Chem.* 272 (43), 26953-26958.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K-M., Krammer, P.H., Peter, M.E.: Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. 1998 *EMBO* 17 (6), 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E.: The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis. 1999 *J. Biol. Chem.* 274 (3), 1541-1548.

Schäfer-Prokop, C.M., Bildgebende Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. 1998 *Onkologe* 4, 221-228.

Schmitz-Dräger, B.J., Anastasiadis, A., Ebert, T.: Nierenzellkarzinom, Stellenwert von Immuntherapie und Chemotherapie. 1998 *Urologe B* 38:385-391

Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J-L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., Tschopp, J.: Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. 1998 *J. Exp. Med.* 187 (8), 1205-1213.

Screaton, G. R., Xu, X. Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J. und Bell, J. I.: LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4615-4619.

Seol, D-W., Billiar, T.R.: A Caspase-9 Variant Missing the Catalytic Site is an Endogenous Inhibitor of Apoptosis. 1999 *J Biol Chem* 274 (4), 2072-2076.

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.: Control of TRAIL-Induced Apoptosis by a Family of Signaling and Decoy Receptors. 1997 *Science* 227, 818-821.

Simonet, W. S., Lacy, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Boyle, W. J., et al.: Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. 1997 *Cell* 18, 309-319.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C., Alnemri, E.S.: FLAME-1, a Novel FADD-like Anti-apoptotic Molecule That Regulates Fas/TNFR1-induced Apoptosis. 1997 *J. Biol. Chem.* 272 (30), 18542-18545.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J., Poyet, J-L., Fernandes-Alnemri, T., Tsichlis, P.N., Alnemri, E.S.: CLARP, a Novel Caspase Recruitment Domain-containing Protein in the Tumor Necrosis Factor Receptor Pathway, Regulates NF-KB Activation and Apoptosis. 1999 *J. Biol. Chem.* 274 (25), 17946-17954.

Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Müller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R.: Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells – A mechanism of immune evasion? 1996 *Nature Medicine*.2 (12), 1361-1366.

Störkel, S.: Epitheliale Tumoren der Niere. 1999 *Urologe A* 38, 425-432.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. 1993 *Cell* 75, 1169-1178.

Sugahara, K., Yamada, Y., Hiragata, Y., Matsuo, Y., Tsuruda, K., Tomonaga, M., Maeda, T., et al.: Soluble and membrane isoforms of Fas/CD95 in fresh adult T-cell leukemia (ATL) and ATL-cell lines. 1997 *Int. J. Cancer*: 72, 128-132.

- Susin, S.A.**, Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H-G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C., Kroemer, G.: The Central Executioner of Apoptosis: Multiple Connection between Protease Activation and Mitochondria in Fas/APO-1/CD95-and Ceramid-induced Apoptosis. 1997 *J. Exp. Med.* 186 (1), 25-37.
- Tanaka, M.**, Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A.H., Nagata, S.: Fas ligand in human serum. 1996 *Nature Medicine* 2 (3), 317-322.
- Tepper, C.G.**, Seldin, M.F.: Modulation of Caspase-8 and FLICE-Inhibitory Protein Expression as a Potential Mechanism of Epstein-Barr Virus Tumorigenesis in Burkitt's Lymphoma. 1999 *Blood*, 94 (5), 1727-1737.
- Thoenes, W.**, Störkel, S., Rumpelt, H. J.: Histopathology and Classification of Renal Cell Tumors (Adenomas, Oncocytomas and Carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. 1986 *Path Res Pract* 181, 125-143.
- Thome, M.**, Schneider, K., Hofmann, H., Fickenscher, E., Meinl, F., Neipel, C., Mattmann, K., Burns, J.-L., Tschopp, J. et al.: Viral FLICE inhibitory protein (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. 1997 *Nature* 368, 517-521.
- Thompson, C.B.**: Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Diseases. 1995 *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry, N.A.**, Lazebnik, Y.: Caspases: Enemies Within. 1998 *Science* 281, 1312-1316.
- Trauth, B.**, Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K. M. und Krammer, P. H.: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. 1989 *Science* 245, 301-305.
- Vidal, O.N.A.**, Sjögren, K., Eriksson, B.I., Ljunggren, Ö., Ohlson, C.: Osteoprotegerin mRNA Is Increased by Interleukin-1 α in Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 and in Human Osteoblast-Like Cells. 1998 *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 248, 696-700.
- Volm, M.**, Kästel, M., Mattern, J., Efferth, T.: Expression of Resistance Factors (P-Glycoprotein, Glutathion S-Transferase- π , and Topoisomerase II)

and Their Interrelationship to Proto-Oncogene Products in Renal Cell Carcinomas. *1993 Cancer Vol. 71, No.12, 3981-3987.*

Von Reyher , U., Sträter, J., Kittstein, W., Gschwendt, M., Krammer, P. H., Möller, P.: Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *1998 Cancer Res. 58, 526-534*

Warzocha, K. Ribeiro, P. Charlot, C., Renard, N. Coiffier, B., Salles, G.: A New Death Receptor 3 Isoform: Expression in Human Lymphoid Cell Lines and Non-Hodgkin's Lymphomas. *1998 Bioch. and Biophys. Res. Comm. 242, 376-379.*

Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M.: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface receptor antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *1989 J. Exp. Med. 169, 1747-1756.*

7 Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. U. Ramp gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, seine Betreuung bei der Durchführung der Experimente, Bewertung der Ergebnisse und Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. med. H. E. Gabbert danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Sachmittel im molekularbiologischen Labor des Pathologischen Instituts der Heinrich-Heine-Universität.

Herrn Dr. C. Mahotka möchte ich besonders für seine Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. O. Grimm aus der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die Auswahl der Patienten und die Bereitstellung der Serien.

Ausserdem möchte ich mich bei den Technischen Assistentinnen Frau A. Florange-Heinrichs und Fr. S. Sliwka für die Unterstützung bei der Arbeit in der Zellkultur und im molekularbiologischen Labor bedanken.

Abschliessend geht mein herzlicher Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Czarnotta
 Vorname Beate
 Geburtsdatum/-ort: 21.01.1975, Düsseldorf
 Anschrift: Michaelstr. 64
 41460 Neuss

Schulbildung:

9/1881 - 6/1985 St.-Hubertus-Grundschule, Neuss
 9/1985 - 5/1994 Nelly-Sachs-Gymnasium, Neuss
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

9/1994 - 6/2001 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf,
 8/1996 Ärztliche Vorprüfung
 8/1997 Erster Abschnitt der Ärztliche Prüfung
 3/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 6/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/2000- 3/2001 Praktisches Jahr am Hospital zum Heiligen Geist, Kempen
 7/2001 – 12/2003 ÄiP und Assistenzärztin in der Internistischen Abteilung des St. Anna Krankenhauses, Duisburg
 1 – 9/2004 Assistenzärztin in der Chirurgischen Abteilung des St. Anna Krankenhauses, Duisburg
 seit 10/2004 Assistenzärztin in der Praxis für Allgemeinmedizin bei Fr. Dr. v. Cube und Fr. Dr. Staib, Neuss

9

Abstract

Die Resistenz von Tumoren gegenüber einer Chemotherapie und/oder einer Bestrahlung stellt ein großes Problem in der onkologischen Behandlung dar. Am Beispiel des ausgesprochen therapierefraktären Nierenzellkarzinoms wurden in dieser Arbeit einige zentrale Faktoren der Apoptose untersucht, die für die Therapieresistenz mitverantwortlich sein können. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Grundcharakterisierung von möglichen Apoptose-Inhibitionsfaktoren gelegt. Darüber hinaus wurden funktionellen Studien hinzugezogen, um eine Einschätzung über die Bedeutung der einzelnen Faktoren im Nierenzellkarzinom zu erhalten.

Zunächst analysierten wir einige Todesrezeptoren der TNF-Familie, die durch Zytostatika aktiviert werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Nierenzellkarzinome sowohl CD95 als auch LARD exprimieren. Bei beiden wurden lösliche Spleißformen gefunden, die als sog. Decoy-Rezeptoren den jeweiligen Liganden (CD95-L bzw. Apo3L) kompetitiv binden können, um so die Apoptose zu inhibieren.

Funktionellen Studien deuten darauf hin, dass die Apoptoseresistenz von Nierenzellkarzinomen nicht allein auf die Modulation auf Rezeptorebene zurückzuführen ist. Hierbei wurde beispielsweise die Reaktion der Nierenkarzinomzelllinien auf die Stimulation mit dem CD95-Induktor CH11 und Interferon- γ untersucht. Hierbei fiel eine primäre Resistenz der Nierenzelllinien gegenüber CH11 auf. Ein Zusammenhang zwischen der Sensitivitätslage der Zelllinien und dem Expressionsstatus von CD95 und CD95-L konnte nicht ermittelt werden. Diese Beobachtung lässt auf einen funktionellen Defekt des CD95-abhängigen Apoptosewegs schließen. Bei der Kostimulation mit CH11 und Interferon- γ konnte die Apoptoseresistenz bei 22 der 30 untersuchten Zelllinien überwunden werden.

Im weiteren Verlauf wurde die Caspasen-Kaskade näher analysiert. Caspase-Inhibitoren sind sehr interessant, da sie an zentralen Punkten des Signalweges angreifen. Hier gelang der Nachweis der inhibitorischen Spleißform Caspase-9s und des Caspase-8-Inhibitors FLIP.

Priv.- Doz. Dr. med. U. Ramp