

**Caspase-2 und PIDD im Nierenzellkarzinom:
Funktionelle Bedeutung für die Induktion von
pro- und antiapoptotischen Signalwegen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katja Mathonet
aus Solingen

Düsseldorf, Juli 2020

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

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

Referent: PD Dr. Csaba Mahotka
Korreferent: Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 4.2.2021

♥ *Für Athene* ♥

♥ *Für Leonidas* ♥

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Nierenzellkarzinom.....	1
1.2	Apoptosedefekte als Ursache für die Tumorentstehung.....	4
1.2.1	Morphologie und Verlauf der Apoptose.....	5
1.2.2	Signalwege der Apoptose.....	7
1.2.3	Apoptoseinduktion durch Zytostatika.....	10
1.3	Die Nekroptose: ein alternativer Signalweg des programmierten Zelltodes.....	10
1.4	NFκB-Signalwege und die Bedeutung für die Tumorentstehung.....	12
1.5	Caspasen als molekulare Regulatoren der Apoptose.....	18
1.5.1	Die Caspase-2: eine ungelöste Frage.....	19
1.6	PIDD als molekularer Schalter zwischen Apoptose und NFκB.....	22
1.6.1	PIDDosomen-Mitglieder.....	23
1.6.2	Isoformen von PIDD und ihre funktionellen Unterschiede.....	26
2.	ZIELSETZUNG.....	28
3.	MATERIALIEN.....	30
3.1	Laborgeräte.....	30
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.2.1	Plastik- und Einwegartikel.....	31

3.2.2	Chemikalien.....	32
3.3	Biologisches Material.....	32
3.4	Kit Systeme.....	32
3.5	Zytostatika.....	32
3.6	Protein- und Nukleinsäurestandards.....	33
3.7	Oligonukleotide.....	33
3.8	Antikörper.....	34
3.9	Software und Server.....	34
4.	METHODEN.....	35
4.1	<i>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....</i>	<i>35</i>
4.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	35
4.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	35
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	36
4.1.4	Zytostatika Behandlungen.....	37
4.2	<i>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....</i>	<i>37</i>
4.2.1	Transienter Knockdown mittels siRNA.....	37
4.2.2	Caspase-Aktivitäts-Assays.....	38
4.2.3	Phospho-Histon H3 Messung.....	38
4.2.4	Propidiumiodid-Färbung.....	40
4.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	40
4.2.6	Photometrische Konzentrationsmessung von RNA und DNA.....	41
4.2.7	DNA-Restriktion.....	42
4.2.8	Reverse Transkription.....	42

4.2.9	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	43
4.2.10	Agarose-Gelelektrophorese.....	46
4.3	<i>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN</i>	47
4.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus eukaryotischen Zellen.....	47
4.3.2	Herstellung von fraktionierten Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen.....	47
4.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	49
4.3.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
4.3.5	Proteintransfer (Western Blot).....	51
4.3.6	Immunoblot.....	52
5.	ERGEBNISSE	53
5.1	Apoptose- und Caspase-3 Aktivierung im Nierenzellkarzinom.....	53
5.2	Expression und Aktivierung der Caspase-2, -8 und -9 nach Apoptose-induktion im Nierenzellkarzinom.....	55
5.3	Expression der „PIDDosomen-Mitglieder“ im humanen Nierenzellkarzinom.....	62
5.4	NFκB ist in p53 mutierten Nierenzellkarzinomzelllinien nach Zytostatikabehandlung aktiviert.....	72
5.5	Bestimmung der Transkriptmenge der PIDD-Isoformen im Nierenzellkarzinom.....	74
5.6	Caspase-2 knockdown führt zu einer erhöhten Caspase-3 Aktivität in humaner Nierenzellkarzinomzelllinie.....	78
5.7	Caspase-2 nimmt Einfluss am G2/M-vermitteltem Zellzyklusarrest im humanen Nierenzellkarzinom.....	80

6.	DISKUSSION.....	83
6.1	Die Beteiligung der Initiator- und Effektorcaspasen an der Zytostatika-induzierten Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom.....	83
6.2	Expression der PIDDosomen-Mitglieder in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien unterschiedlicher Resistenz nach Apoptoseinduktion.....	85
6.3	Die NFκB-Aktivierung im Nierenzellkarzinom im Hinblick auf das NEMO-PIDDosom.....	91
6.4	Die funktionelle Bedeutung der Caspase-2 im Nierenzellkarzinom.....	93
6.5	Das multifunktionale Protein PIDD im humanen Nierenzellkarzinom.....	95
6.6	Perspektiven.....	98
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
8.	QUELLENVERZEICHNIS.....	101
9.	ANHANG.....	114
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	114
9.2	Tabellenverzeichnis.....	114
9.3	Abkürzungen.....	115
10.	DANKSAGUNG.....	119
11.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	120

1. Einleitung

1.1 Das humane Nierenzellkarzinom

Die Entstehung maligner Tumoren der Nieren kann von verschiedenen Geweben ausgehen. Die Nierenzellkarzinome (RCC: renal cell carcinoma) treten allerdings im Erwachsenenalter mit einem Anteil von 90% am häufigsten auf. Die Inzidenz ist dabei höher für Männer als für Frauen. Laut Daten des Robert-Koch Instituts gab es im Jahr 2016 in Deutschland 9280 Neuerkrankungen bei Männern, hingegen 5360 bei Frauen. Wird die Diagnose in frühen Stadien gestellt, ist die Prognose vergleichsweise günstig. Als wichtigste Risikofaktoren zählen Rauchen bzw. Passivrauchen. Aber auch Übergewicht, Bluthochdruck oder Alkoholkonsum spielen eine Rolle. Genetische Faktoren, sprich die familiäre Prädisposition ist in nur wenigen aller Fällen von Bedeutung. Dabei ist häufig das von Hippel-Lindau (VHL) Syndrom ursächlich für die Tumorentstehung und tritt dann auch bei jüngeren Menschen zu Tage. Hierbei handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen. Die Inaktivierung beider Allele durch einen mutagenen Effekt bzw. den völligen Verlust der Allele ist dann Ursache für die Tumorentstehung (Knudson 1993). Chronische Niereninsuffizienz begünstigt lediglich unabhängig der Ursachen die Tumorentstehung. Histologisch unterscheidet man verschiedene Subtypen des humanen Nierenzellkarzinoms: das Klarzellige, das Papilläre und das Chromophobe Nierenzellkarzinom (Thoenes et al. 1986). Histologisch zeichnet sich das klarzellige RCC durch ein klar definiertes Zytoplasma bei konventionellen Färbemethoden aus, welches Akkumulationen von Glykogen und Phospholipiden aufweist. Die Entstehung dieses reichlich vaskulären Tumors geschieht aus dem proximalen Tubulus. Allelverluste sind ebenfalls charakteristisch für diesen Subtyp, der etwa 80% bis 85% aller Nierentumore ausmacht (Arai and Kanai 2010; Storkel 1999). Mutationen in einem der Allele des VHL Gens („LOH“ Loss of heterozygosity) sind in ca. 90% aller klarzelligen RCC vorzufinden (Kondo et al. 2002). Das Papilläre RCC ist der zweithäufigste Subtyp und gliedert sich wiederum in zwei Subtypen (Klatte et al. 2009). Kennzeichnend hierfür ist die Bildung papillärer oder tubulärer Muster. Typ I besitzt basophile Zellen, Typ II hingegen eosinophile Zellen, die ebenfalls aus dem proximalen Tubulus entstehen, allerdings wenig vaskularisiert ist. Ist dieser Tumor nicht metastasiert, ist die Prognose besser als die des klarzelligen RCC (Steffens et al. 2012).

Das Chromophobe RCC, welches aus dem kortikalen Anteil des Sammelrohrs entsteht, weist typischerweise ein weitestgehend leeres Zytoplasma auf. Die fehlende Färbung des Zytoplasmas war namensgebend für diesen Tumor. Außerdem ist er gekennzeichnet durch den Verlust von Chromosom 1, 2, 6, 10, 13 17 und/oder 21 (Schwerdtle et al. 1996; Speicher et al. 1994). Auch eine geringe mitotische Teilungsrate ist ein häufiges Charakteristikum. Das Onkogen KIT ist in diesem Subtyp auffällig erhöht exprimiert und das Genprodukt findet sich an allen Zellmembranen von nur chromophoben RCC`s wieder, so dass es sich um einen möglichen therapeutischen Target handeln könnte (Yamazaki et al. 2003). Neben diesen drei Subtypen des RCC`s gibt es noch einige weitere Formen des Nierenzellkarzinoms, die jedoch weniger als 1% der Nierentumore bilden. In dieser Arbeit wurden Nierenzellkarzinomzelllinien wie auch Nierengewebebeobachten verschiedener Stadien verwendet. Humane Nierentumore des Stadiums pT1 definieren sich dabei über ihre Begrenzung auf das Nierengewebe und sind dabei nicht größer als 7cm. Bei dem Tumorstadium pT2 handelt es sich um Tumore, die ebenfalls auf die Niere begrenzt sind und eine Größe von 7 – 10cm aufweisen. pT3 Tumore hingegen sind nicht mehr begrenzt auf die Niere, sondern bereits infiltrierend auf umliegendes Gewebe. Dabei wird je nach Infiltration in pT3a – pT3c Subtypen unterschieden. Das Wissen rund um das humane Nierenzellkarzinom ist jedoch in den letzten Jahren rapide gewachsen, und so konnten neue, seltener Subtypen, des RCC`s definiert werden, wie z.B. das Xp11 Translocation RCC oder das Spindel-Zellkarzinoma (Crumley et al. 2013). Das molekulare Verständnis der humanen RCC`s, als auch der neuen Entitäten ist daher sowohl für die Diagnose, als auch die Behandlung und Prognose maßgeblich.

1.1.2 Die Resistenz des humanen Nierenzellkarzinoms gegenüber Chemotherapien

Ein typisches Charakteristikum für das humane Nierenzellkarzinom ist eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Während in anderen Tumorarten ein Mutationsstatus des Tumorsuppressors p53 für die Resistenz gegenüber der Apoptose, Chemo- und Radiotherapie verantwortlich gemacht werden konnten, zeigt das Nierenzellkarzinom trotz einer weitgehend geringen p53-Mutationshäufigkeit eine kennzeichnende Resistenz (Soussi 2000 ; Wallace-Brodeur and Lowe 1999). Bis heute sind die

Ursachen nicht geklärt. Man vermutete in Vergangenheit als Ursache die Überexpression des *mdr* I-Gens (multidrug resistance I), welches für ein membranständiges Protein codiert, das als Effluxpumpe durch Entgiftungen die Zytostatikakonzentration in der Tumorzelle verringert (Fojo et al. 1987). Allerdings konnten entsprechende Inhibitoren für p170 die Resistenz nicht überwinden (Hartmann and Bokemeyer 1999). Daher müssen noch weitere Mechanismen existieren, die zur Resistenz beitragen, wie Defekte in apoptotischen Signalwegen. Auch seit den Entwicklungen in der Immuntherapie gegen Krebs, darunter die rekombinant synthetisierten Zytokine Interleukin-2 und Interferon- α , konnten noch keine großen Fortschritte für die Therapie des RCC verzeichnet werden. Neue Ansätze untersuchen einen möglichen synergistischen Effekt von therapeutischen Vakzinen wie z.B. IMA-901 und AGS-003 und anti-Angiogenese wirkenden Substanzen (Combe et al. 2015). Sunitinib beispielsweise ist eine Substanz, die die Tumorangio-genese beeinflusst. Es handelt sich um einen Tyrosin Kinase Inhibitor des VEGF (vascular endothelial growth factor) Rezeptors. Zwar haben Substanzen wie Sunitinib einen Einfluss auf das Resultat auf Patienten mit metastasierendem RCC gezeigt, jedoch ist dieser Erfolg bei der Häufigkeit der auftretenden Resistenzen gedämpft (Joosten et al. 2015). Weiterhin gibt es neue Strategien, die auf die Regulation der Entzündungsantwort der Zelle zielen. Die inflammatorischen Signalwege wie VHL, TNF- α oder auch TGF- β , sowie die downstream Transkriptionsfaktoren und Zytokine müssen zukünftig weiter erforscht werden. Es gibt bislang einige Inhibitoren für inflammatorische Signalwege, die in der Zukunft für die Behandlung von Nutzen sein könnten (de Vivar Chevez et al. 2014). Aber auch das molekulare Verständnis von pro- und antiapoptotischen Signalwegen muss noch exakter verstanden werden, um weitere Ansätze möglicher Therapien zu entwickeln. Zum Verständnis illustriert folgende Abbildung die Kennzeichen von Krebs auf, die während der Tumorentwicklung erworben werden. Die Kennzeichen umfassen sechs biologische Fähigkeiten und bilden ein Grundsatz, um die Komplexität neoplastischer Krankheiten zu untermauern, die auf genomischer Instabilität beruhen. Sie beinhalten die Aufrechterhaltung von proliferativen Signalen, das Umgehen von Wachstumssuppressoren, das Standhalten gegenüber dem Zelltod, das Ermöglichen der weiterer replikativer Unsterblichkeit sowie die Aktivierung der Invasion und Metastasierung (Hanahan et Weinberg, 2011).

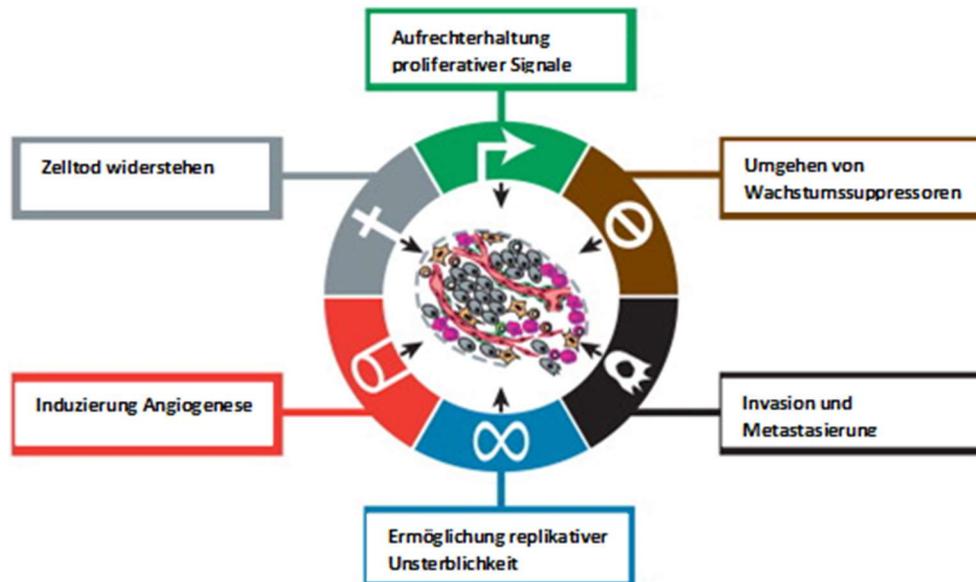


Abb.1: Kennzeichen von Krebs (modifiziert nach Hanahan et Weinberg, 2011)

1.2 Apoptosedefekte als Ursache für die Tumorentstehung

Die Antwortmöglichkeiten einer Zelle auf Stress oder einen DNA-Schaden sind vielfältig und führen meist zunächst zu einer simultanen Aktivierung von sowohl DNA-Reparaturmechanismen, dem Arretieren der Zelle am Zellzyklus Checkpoint, der Aktivierungen von Apoptose als auch von Zellüberlebenssignalwegen, wie NFκB (nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells). Ob die Zelle letztendlich in die Apoptose eintritt und diese vollständig verläuft, ist abhängig von der Balance zwischen pro- bzw. antiapoptotischen Signalen. Schon Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Apoptose als ein physiologischer Prozess beobachtet, der bei der Embryogenese und der Metamorphose involviert ist. Glücksmann lieferte etwa hundert Jahre später eine erste Zusammenfassung der Apoptose (Glücksmann 1951). Demnach schien es sich um einen aktiven und gesteuerten Prozess zu handeln, so dass sich der Begriff „programmierter Zelltod“ erstmals 1964 prägte (Lockshin and Williams, 1964). Später dann wurde der Begriff „Apoptose“ von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt, der die morphologischen Aspekte dieses Phänomens genauer beschrieb (Kerr et al. 1972). Fehlregulationen oder Defekte der Apoptose können ursächlich oder

verstärkend zur Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Krebs, neurodegenerative Leiden oder Autoimmunkrankheiten wie AIDS sein (Fadeel et al. 1999). Apoptose ist in der Evolution ein durchweg hoch konserviertes und reguliertes Ereignis (Samali et al. 1996) welches durch verschiedene Stimuli wie oxidativer Stress, Strahlung oder auch Chemotherapeutika getriggert werden kann und damit einen guten Angriffspunkt für Therapien darstellt. Eine Deregulation kann ferner auch zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen, da die Wirkmechanismen der Zytostatika über eine Induktion proapoptotischer Prozesse verlaufen und somit einen Rückgang der Tumoren erzielen (Barry et al. 1990; Hickman 1992). Daher ist das genaue Verständnis der molekularen Prozesse während der Apoptose von großer Bedeutung.

1.2.1 Morphologie und Verlauf der Apoptose

Die morphologischen Kennzeichen während der Apoptose lassen sich deutlich von der Nekrose abgrenzen: Die in der Apoptose befindliche Zelle schrumpft, deformiert und verliert Kontakt zu benachbarten Zellen. Schließlich löst sie sich aus dem Zellverband eines Gewebes ab. Dabei bleibt die Zellmembran jedoch intakt und bildet kleine Knospungen, was man als „blebbing“ oder „budding“ bezeichnet. Die Nekrose hingegen wird z.B. durch traumatische Gewebeverletzung induziert und ist durch ein Anschwellen der Zelle gekennzeichnet, was zum Aufplatzen der Zelle führt. Da hierbei der gesamte Zellinhalt austritt, kommt es bei der Nekrose zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes. Die morphologischen Phasen während der Apoptose basieren auf biochemische Prozesse und lassen sich in drei Phasen aufteilen (Saraste and Pulkki 2000): In der Initiationsphase wird das Signal für den Zelltod durch Stimuli wie die Bindung von proapoptotischen Liganden an Todesrezeptoren, DNA-Schäden oder Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst. In der zweiten, der Effektorphase, leitet die Zelle für die Apoptose notwendige Stoffwechselprozesse ein. Das Chromatin kondensiert und es kommt zur Aktivierung von Nukleasen, die die DNA in ihre Fragmente spalten. Proteine, die normalerweise die Integrität des Zytoplasmas und der Organellen bestimmen, werden durch proteolytische Enzyme gespalten. Im letzten Stadium, der Degradationsphase, werden die fragmentierten Bestandteile der Zelle in kompakte,

Membran-verkapselte Strukturen verpackt, die man „apoptotic bodies“ nennt. Diese können dann von Makrophagen aufgenommen und aus dem Gewebe beseitigt werden, ohne dass es zu einer inflammatorischen Antwort und einer Schädigung umliegender Zellen kommt, wie es bei der Nekrose der Fall ist. Wenn die Zelle allerdings einem Energiemangel ausgesetzt ist oder der Schaden fulminant ist, kann sich die Apoptose noch im Laufe zur sekundären Nekrose hin wandeln und die Zelle lytische Prozesse durchlaufen bzw. parallel oder hintereinander ablaufen (Columbano 1995; Leist et al. 1997; Villalba et al. 1997).

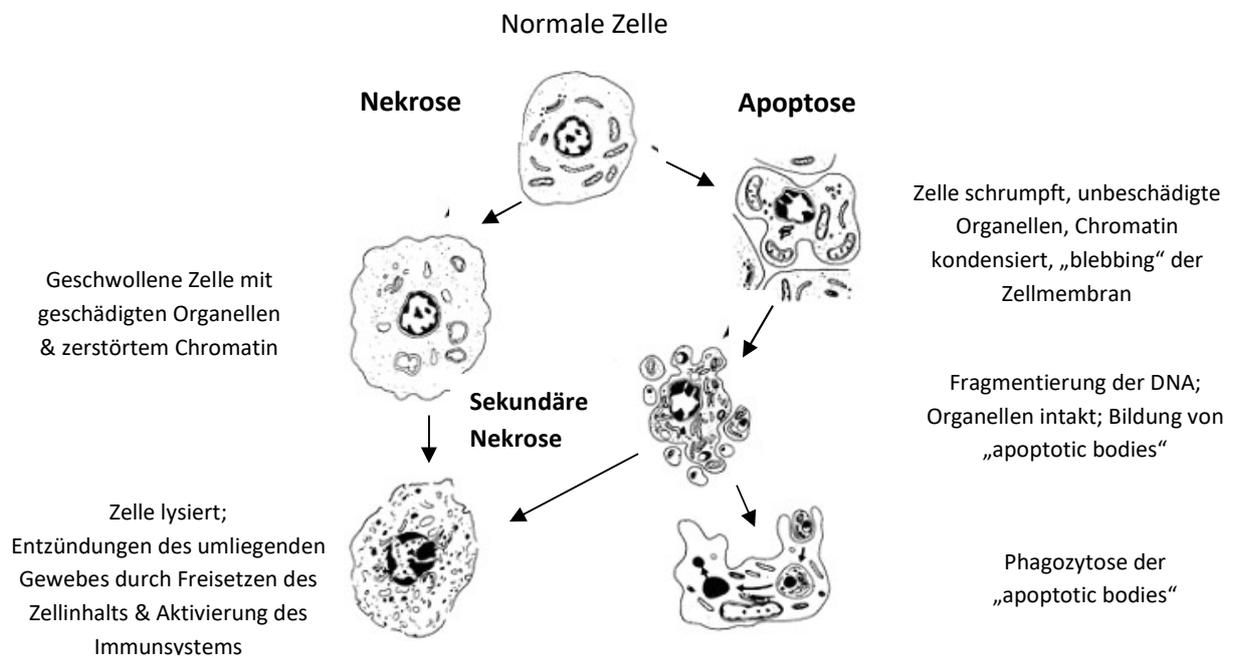


Abb.2: Darstellung der morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (modifiziert nach Williams et al. 1992)

1.2.2 Signalwege der Apoptose

Apoptose kann sowohl durch externe als auch durch interne Signale ausgelöst werden, wie z.B. durch Exposition von UV- oder γ -Strahlung, DNA-Schäden aufgrund von Defekten des DNA-Reparatursystems oder entwicklungsbedingten Todessignalen einer normalen Embryogenese. Daher unterscheidet man zwischen zwei Signalwegen, die man auch als extrinsisch bzw. intrinsisch bezeichnet. Die extrinsisch eingeleitete Apoptose verläuft über die Bindung von zytotoxischen Liganden an sog. Todesrezeptoren an der Zelloberfläche, so dass man auch von einer „Rezeptor-vermittelten Apoptose“ spricht. Der Hauptteil der Liganden wird dabei von Zellen des Immunsystems gebildet (Hehlgans and Pfeiffer 2005). Die Intrinsische Signalübertragung hingegen, z.B. ausgelöst durch DNA-Schäden oder Strahlung, schließt eine Aktivierung des Tumorsuppressors p53 ein, was eine Aktivierung der Mitochondrien zur Folge hat. Bei beiden Signalwegen stellen Caspasen, die eine Familie von Cysteinproteasen bilden, zentrale Regulatoren dar (Degterev et al. 2003). Caspasen werden als Zymogene, eine inaktive Vorstufe synthetisiert, die durch verschiedene Mechanismen während der Apoptose aktiviert werden können, die in Kapitel 1.5 näher erläutert werden.

1.2.2.1 Extrinsischer Weg: die Rezeptor-vermittelte Apoptose

Stimulation von Todesrezeptoren der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Superfamilie durch ihre zugehörigen Liganden aktivieren den „Extrinsischen Signalweg“ der Apoptose. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie besitzen die Todesrezeptoren zusätzlich eine intrazelluläre Domäne in der Nähe des C-Terminus aus ca. 80 Aminosäuren. Da diese Domäne verantwortlich für Induktion der Apoptose ist, wird sie auch als „Todesdomäne“ (DD, death domain) bezeichnet (Tartaglia et al. 1993). Die Bindung von trimerisierten Liganden an Todesrezeptoren wie CD95 (APO-1/Fas) oder den TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) -Rezeptoren DR4 und DR5 (death receptor) führt zur Tri- bzw. Oligomerisierung der Rezeptoren, was folgend eine Aktivierung der Caspasen-Kaskade in Gang setzt. Zunächst formt der Todesrezeptor durch Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain) zusammen mit den Procaspasen-8 und -10 den sog. death-inducing signaling

complex, kurz „DISC“ (Ashkenazi and Dixit 1998; Kischkel et al. 1995; Kischkel et al. 2000). Die Rekrutierung bewirkt eine Aktivierung der beiden Procaspasen-8 und -10, die im Weiteren die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 durch Spaltung aktivieren und so die Apoptose einleiten (Ashkenazi 2008). Innerhalb der Apoptoseinduktion über den CD95 (Apo-1/Fas)–Rezeptor werden zwei verschiedene Signalwege unterschieden (Scaffidi et al. 1998): In den meisten Zellen wird die Aktivierung der Effektorcaspase-3 durch Caspase-8 des DISC-Komplex vermittelt. Zellen mit einer solchen direkten Aktivierung der Caspase-3 werden auch als Typ I-Zellen bezeichnet. Hingegen dazu gibt es Typ II-Zellen, in denen es lediglich zu einer reduzierten Bildung des DISC-Komplexes kommt und damit zu einer geringeren Aktivität der Caspase-8. Die Aktivierung von Caspase-8 sowie Effektorcaspasen wurde erst verzögert nach einer Senkung des Membranpotentials der Mitochondrien beobachtet. Die Beteiligung der Mitochondrien wird dabei durch die Caspase-8 abhängige Spaltung von Bid, ein BH3-only Protein (BH3 interacting domain death agonist) in seine aktive Form, tBid (trunkiertes Bid) vermittelt. tBid, ein Mitglied der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma), aktiviert weiterhin Caspase-9, die wiederum für die Aktivierung von Effektorcaspasen verantwortlich ist. Eine Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-xL in beiden Zelltypen bewirkt nach CD95-Stimuli eine vollständige Blockierung aller apoptogenen Aktivitäten der Mitochondrien (Scaffidi et al., 1998). Dies verdeutlicht, dass es zwischen der Extrinsischen und der Intrinsischen Apoptose durchaus zu einem gekoppelten Ereignis kommen kann. In den meisten Tumorzellen scheint die Signalübertragung über TRAIL intakt und unabhängig von p53 zu verlaufen und birgt daher Potential für zukünftige Therapiestrategien (Ashkenazi et al. 1999).

1.2.2.2 Intrinsischer Weg: die durch DNA-Schaden vermittelte Apoptose

Liegt z.B. eine irreparable Schädigung der DNA oder des Zytoskelettes vor, kann der programmierte Zelltod auch über eine „intrinsische Signalvermittlung“ verlaufen. Die Einleitung der Apoptose über diesen Weg erfolgt ebenfalls über eine Aktivierung von Caspasen, die allerdings über die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie Cytochrom c, Procaspase-2 und AIF (apoptosis inducing factor) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien gesteuert wird (Liu et al. 1996; Susin et al. 1999a; Susin et al. 1999b).

Mechanismen, die zur Freisetzung solcher Faktoren führen, können z.B. über den Tumorsuppressor p53 induziert werden. p53 wird durch Schädigung der DNA aktiviert und induziert die Transkription beispielsweise von PUMA und NOXA, proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie. Dies wiederum aktiviert die Proteine BAX und BAK, ebenfalls proapoptotische Mitglieder dieser Proteinfamilie, die die Freisetzung von Cytochrom c veranlassen (Ashkenazi 2008; Zhivotovsky et al. 1998). Dabei bilden oligomerisiertes BAX und BAK Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran aus, über die Cytochrom c dann ins Zytosol der Zelle gelangen kann (Gross et al. 1999). Freigesetztes Cytochrom c bildet im Zytoplasma zusammen mit Apaf-1 und Caspase-9 das sog. Apoptosom, welches schließlich eine Aktivierung der Effektor-Caspasen-3 und -7 bewirkt und so den Zelltod veranlasst (Zou et al. 1999). Ein weiterer freigesetzter proapoptotischer Faktor aus den Mitochondrien namens SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low isoelectric point), bindet und inhibiert im Zytoplasma eine Reihe von IAP-Proteinen (Inhibitor of apoptosis proteins) wie cIAP-1 oder cIAP-2 (Anguiano-Hernandez et al. 2007; Yang and Du 2004). Im aktiven Zustand hemmen IAPs die Effektor-Caspasen-3 und -7 und wirken damit antiapoptotisch (Deveraux et al. 1997; Roy et al. 1997). Interessanterweise zeigten Versuche einen Einfluss von tRNA auf Cytochrom c. Dabei bindet tRNA, besonders mitochondriale tRNA, bis dahin durch ihre Funktion in der Proteinbiosynthese bekannt, direkt an Cytochrom c und inhibiert die Cytochrom c-vermittelte Apoptose (van Raam and Salvesen 2010). tRNA wird zudem durch die Onkogene c-Myc und Ras co-stimuliert und von den Tumorsuppressoren RB (Retinoblastomprotein) und p53 gehemmt; zwei Klassen von Genen, die in Tumorzellen typischerweise mutiert sind. Daher unterstreicht die Studie tRNA als ein potentiell Ziel für die Entwicklung neuer Tumormedikamente, die Tumorzellen durch tRNA-Degradation wieder sensitiv gegenüber der Apoptoseinduktion machen würden. Daneben sind tRNA-Methyltransferasen (TRM) ein weiteres Ziel: sie modifizieren tRNA's, wobei eine aberrante TRM-Aktivität auf die Translation Einfluss nehmen kann, die dann die Entwicklung von Tumorzellen vorantreiben kann (zusammengefasst in Endres et al., 2019).

1.2.3 Apoptoseinduktion durch Zytostatika

Zytostatika werden in der Chemotherapie zur Krebsbekämpfung eingesetzt und sind eine Gruppe synthetischer oder natürlicher Stoffe, die hemmend auf das Zellwachstum in bestimmten Phasen des Zellzyklus wirken (Barry et al. 1990; Hickman 1992). Gebräuchliche Zytostatika sind meistens genotoxisch oder mitotoxisch: sie induzieren einen DNA-Schaden, was in der Regel zu einer p53-vermittelten Apoptose bzw. einem Zellzyklusarrest führt (Lane 1992; Lowe et al. 1993) oder eine Schädigung des Spindelapparates während der Mitose hervorruft. Das Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53 reguliert als ein Transkriptionsfaktor die Expression vieler Gene, nimmt in der Zellzyklusregulation eine zentrale Rolle ein und ist darüber hinaus auch an der DNA-Reparatur, der Angiogenese sowie der Seneszenz beteiligt. Man bezeichnet p53 daher auch gerne als „Wächter des Genoms“. In ca. 50% aller Tumore liegt p53 mutiert vor (Wang and Sun 2010). Ein genotoxischer Stoff, der p53 stabilisiert, ist z.B. Topotecan, ein Camptothecin-Derivat, welcher aus der Pflanze *Camptotheca acuminata* gewonnen wird. Die Wirkung von Topotecan basiert auf Hemmung des Enzyms Topoisomerase I, welches für die Topologie der DNA verantwortlich ist (O'Brien et al. 2007) und wurde in dieser Arbeit als Apoptose Induktor verwendet.

1.3 Die Nekroptose: ein alternativer Signalweg des programmierten Zelltodes

In den letzten Jahren hat die sogenannte Nekroptose für die molekulare Tumorthherapie immer mehr an Interesse gewonnen. Die Nekroptose, oder auch programmierte Nekrose, unterscheidet sich von der Apoptose hauptsächlich durch Defekte in der Caspasen-Aktivierung (Kaczmarek et al. 2013). Ein frühes morphologisches Merkmal der Nekroptose ist das Anschwellen von Zellorganellen wie Endosomen, Golgi-Apparat und der Mitochondrien. Diese Form des programmierten Zelltodes ist ebenfalls Rezeptor-vermittelt: durch die Trimerisierung des TNF-Rezeptors 1 (tumor necrosis factor) nach Aktivierung durch dessen Liganden kommt es zur Bildung des sog. Komplex I, der aus TRADD, TRAF2, cIAP1/2 und RIP1 besteht. Wird RIP1 jedoch ubiquitiert, kommt es im weiteren Verlauf zur Rekrutierung von NEMO und damit zur Aktivierung des NFκB-Signalweges und zum Zellüberleben (s. Kapitel

1.4). Interagiert RIP1 mit aktivierter Caspase-8 und FADD, dem Komplex IIa, wird die Apoptose eingeleitet (s. Kapitel 1.2). Ist die Caspase-8 jedoch aufgrund von Defekten inaktiv, kann dennoch eine alternative Form zur Apoptose, also zum programmierten Selbstmord der Zelle, durch die Nekroptose initiiert werden. Zentrale Schlüsselproteine sind hier RIP1, RIP3 und MLKL die zusammen den Komplex IIb bilden und auch als "Nekrosom" bezeichnet werden (Cho et al. 2009; He et al. 2009; Zhou and Yuan 2014). MLKL ist als ein Effektorprotein der Nekroptose bekannt und spielt hierbei für die nachfolgende Permeabilisierung der Zellmembran während der Nekroptose eine Rolle (Sun et al. 2012). Nach dessen Oligomerisierung und Phosphorylierung durch RIP3 kommt es zur Translokation zur Plasmamembran, die unter Einfluss von Ca^{2+} und möglicherweise auch Na^{2+} Ionen durchlässig gemacht wird (Cai et al. 2014; Sun and Wang 2014). Außerdem können auch die Proteine FADD und Caspase-8 in dem Komplex IIb vorhanden sein, jedoch handelt es sich dann um inaktive Caspase-8, so dass RIP1 nicht gespalten werden kann (Lin et al. 1999). Die Aktivität der RIP1 Kinase hingegen ist für die Nekroptose essentiell: Necrostatin, ein Inhibitor von RIP1 ist in der Lage, diesen Signalweg zu hemmen (Degterev et al. 2005; Degterev et al. 2008). Die Deubiquitinierung von RIP1 wird durch CYLD, einem K63-spezifischen Deubiquitinierungsenzym, gewährleistet und ist ebenfalls für die Bildung des Nekrosoms unabkömmlich (Hitomi et al. 2008; Moquin et al. 2013). A20 hingegen, ein Ubiquitin-editierendes Protein konnte als ein negativer Regulator der Nekroptose identifiziert werden: es entfernt K63-verkettete Polyubiquitinketten im Austausch mit K48-geknüpften Polyubiquitinketten von RIP1, was infolge dessen proteasomal abgebaut wird und der Komplex IIb somit unterbleibt (Vanlangenakker et al. 2011; Wertz et al. 2004). Interessanterweise gibt es bereits einige Substanzen, die als mögliche Kandidaten einer neuartigen Krebstherapie getestet werden. Dieser alternative Weg der programmierten Nekrose könnte ein Weg zur Überwindung von Apoptose-resistenten Zellen sein. Ein Beispiel, welches sich bereits in klinischer Erprobung findet, ist Imatinib (Cho and Park 2014; Pan et al. 2015). In einer Studie konnte 2004 gezeigt werden, dass Imatinib, ein Inhibitor des Protoonkogens Abl, den Zelltod in Apoptose-defekten Zellen unabhängig der Präsenz von Caspase-8 induzieren konnte (Okada et al. 2004). Außerdem wurde die Caspase-2 als ein negativer Regulator der Nekroptose identifiziert (Zamaraev et al., 2018). In Eierstockkarzinomzellen konnte demnach nach Hemmung durch

den Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk eine erhöhte Nekroptose verzeichnet werden. Im Folgenden ist der Nekroptose Signalweg bzw. das Umschalten auf andere Zelltodeswege, bildlich veranschaulicht.

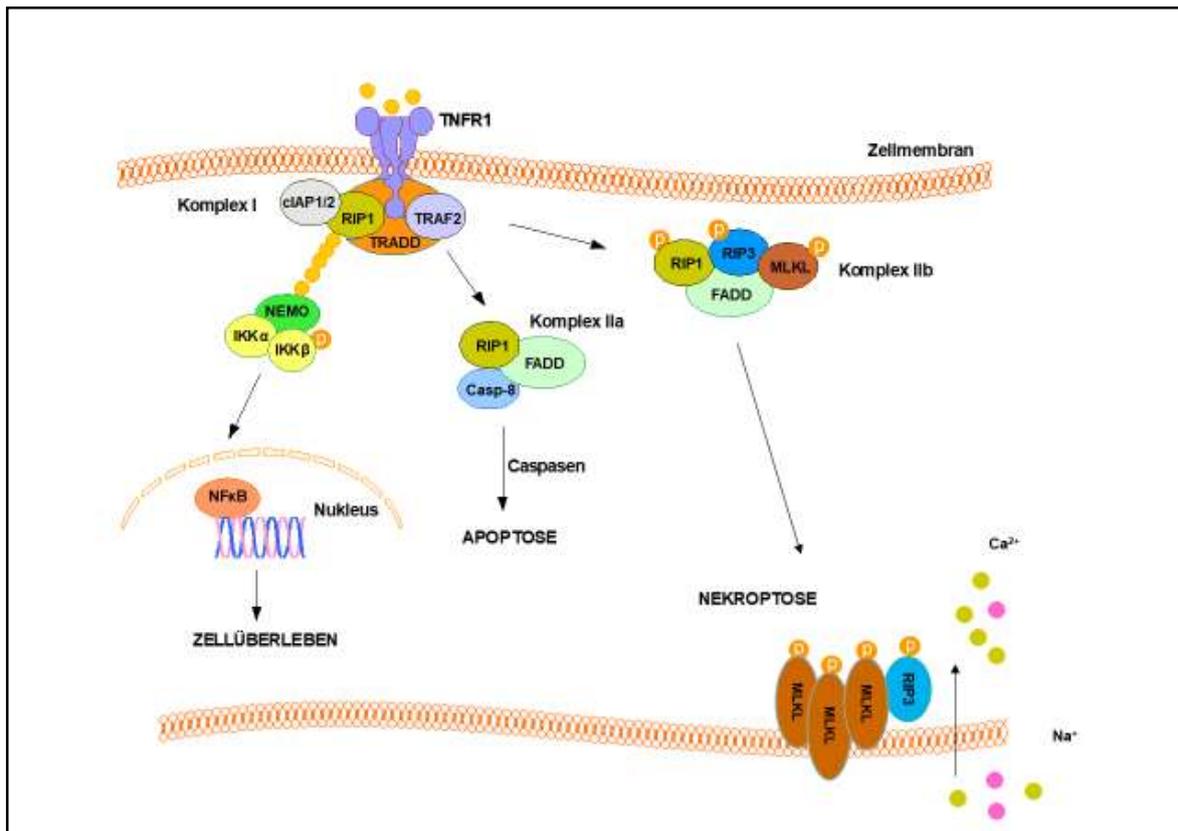


Abb.3: TNF-Rezeptor 1 vermittelte Signalwege: NFκB, Apoptose und Nekroptose

Die Abbildung gibt einen schematischen Überblick der drei Signalwege die das Zellüberleben, die Apoptose und die Nekroptose, einen alternativen Weg zum programmierten Selbstmord der Zelle, darstellt. So kommt es nach Bindung des Liganden an den TNF Rezeptor 1 zur Bildung des sogenannten Komplex I auf der cytoplasmatischen Seite, bestehend aus cIAP1/2, RIP1, TRAF2 und TRADD. RIP1 wird daraufhin von cIAP polyubiquityniert, was in Verbindung mit K 63 geschieht, wodurch im Weiteren der IKK Komplex rekrutiert wird, was zur Aktivierung von NFκB führt. In Abwesenheit von cIAP1 oder FLIP kommt es zur Bildung des Komplex IIa, bestehend aus RIP1, Caspase-8 und FADD, der die Caspasen-Kaskade aktiviert was in der Apoptose mündet. Komplex IIb aus RIP1, RIP3 und MLKL hingegen wird gebildet, wenn Caspase-8 inhibiert ist. Die Kinase-Aktivität von RIP1 ist dabei essentiell für die Bildung des Komplex IIb, der im weiteren Verlauf Nekroptose induziert. Dies geschieht durch Phosphorylierung von RIP3 und MLKL, die dann zur Plasmamembran translozieren und diese permeabilisieren können (modifiziert nach Zhou and Yuan 2014).

1.4 NFκB -Signalwege und die Bedeutung für die Tumorentstehung

Die NFκB Familie umfasst fünf Transkriptionsfaktoren, die durch die Regulation von Targetgenen verschiedene Prozesse in der Zelle regulieren, wie beispielsweise Entzündungsreaktionen, Zellüberleben, -proliferation und -differenzierung. Auch die Regulation der Immunantwort wird über NFκB gesteuert. Die NFκB Proteine NFκB 1 (p50), NFκB 2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel (Rel), sind im Zytoplasma als Dimere lokalisiert. Sie alle besitzen eine hochkonservierte, ca. 300 Aminosäuren lange N-terminale Rel-Homologie Domäne (RHD), mit der sie an die DNA binden können, um die Genexpression zu beeinflussen (Gilmore 1990). Durch bestimmte Proteindomänen, die Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren rekrutieren, können die Faktoren sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Gentranskription wirken. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NFκB Dimere nicht nur an Promotoren und Enhancer Elemente binden können, sondern darüber hinaus den Chromatinumbau regulieren (Natoli 2012). Die "NFκB-Proteine" NFκB 1 und NFκB 2 können allerdings nur als Transkriptionsaktivatoren wirken, wenn sie Heterodimere mit den "Rel-Proteinen" RelA, RelB oder c-Rel bilden, die am C-Terminus eine sogenannte Transaktivationsdomäne besitzen (Gilmore 2006). Im Zytoplasma werden die NFκB Transkriptionsfaktoren selbst durch IκB- (Inhibitor of kappa B) Proteine inhibiert (Hayden and Ghosh 2014). Die acht bislang identifizierten IκB-Proteine IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, BCL-3, IκBns, sowie die NFκB Vorläuferproteine p100 (NFκB 2) und p105 (NFκB 1) maskieren dabei die nukleäre Lokalisationssequenz NLS ("nuclear localization sequenz"). Man unterscheidet zwei Hauptsignalwege: den klassischen (kanonischen) NFκB Signalweg und den alternativen (nicht-kanonischen) NFκB Signalweg. Inzwischen geht man allerdings von einem dritten Weg aus, dessen Regulation jedoch bislang unklar ist (Gilmore, 2006). Dadurch, dass NFκB Transkriptionsfaktoren die verschiedensten Targetgene, die in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen involviert sind regulieren können, stellen sie eine bedeutende Gruppe für die Entwicklung von Inhibitoren in der Therapie menschlicher Erkrankungen dar wie Krebs, da unter den Targetgenen auch Onkogene und antiapoptotisch wirksame Gene vorzufinden sind.

Tab.1: NFκB Targetgene (Pahl 1999)

Targetgen	Funktion	Referenz
<i>Regulatoren der Apoptose</i>		
Bcl-xL	Pro-survival Bcl-2 homologue	Chen et al., 1999; Lee et al., 1999
cCD95 (Fas)	Pro-apoptotic receptor	Chan et al., 1999
Fas-Ligand	Inducer of apoptosis	Matsui et al., 1998
IAPs	Inhibitors of Apoptosis	You et al., 1997; Stehlik et al., 1998
<i>Cytokine/Chemokine</i>		
IFN-γ	Interferon	Sica et al., 1992; Sica et al., 1997
IL-1α	Interleukin-1 α	Mori and Prager, 1996
IL-1β	Interleukin-1 β	Hiscott et al., 1993
TNFα	Tumor necrosis factor α	Shakhov et al., 1990; Collart et al., 1990
TNFβ	Tumor necrosis factor β	Paul et al., 1990; Messer et al., 1990
<i>Wachstumsfaktoren</i>		
VEGF C	Vascular Endothelial Growth Factor	Chilov et al., 1997
IGFBP-2	insulin-like growth factor binding protein-2	Cazals et al., 1999
<i>Transkriptionsfaktoren</i>		
A20	TNF-inducible zinc finger	Krikos et al., 1992
c-myc	Proto-oncogene	Duyao et al., 1992
c-rel	Proto-oncogene	Hannink and Temin, 1990
IκBα	Inhibitor of Rel/NF-κB	Haskill et al., 1991; Sun et al., 1993
nfkb2	NF-κB p100 precursor	Lombardi et al., 1995
nfkb1	NF-κB p105 precursor	Ten et al., 1992
p53	Tumor suppressor	Wu and Lozano, 1994
<i>Sonstige</i>		
Cyclin D1	Cell-cycle regulation	Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999
Laminin B2	Chain Basement membrane protein	Richardson et al., 1995
Vimentin	Intermediate filament protein	Lilienbaum et al., 1990
Wilms Tumor Suppressor Gene	Tumor suppressor	Dehbi et al., 1998

1.4.1 Der klassische NFκB Signalweg

Der klassische - oder auch kanonische - NFκB Signalweg wird durch die proteasomale Degradation von IκBα reguliert, was als Folge der Bindung des TNF (Tumornekrosefaktor) Liganden an den Rezeptor TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1) geschieht. Erstmals konnte eine Bindung von NFκB infolge einer TNF-Aktivierung im HIV Typ 1 an den LTR (long terminal repeats) der DNA des Retrovirus gezeigt werden (Duh et al. 1989; Osborn et al. 1989). Wie bereits erwähnt inhibieren die IκB Proteine durch Maskierung des nukleären Lokalisationssignals NLS die NFκB Transkriptionsfaktoren, so dass sie im Zytoplasma als inaktive Dimere verbleiben (Oeckinghaus and Ghosh 2009). Die NFκB Proteine p50/RelA können nach Degradation von IκB in den Nukleus translozieren und die Targetgenexpression regulieren. Aber auch andere Liganden und deren Rezeptoren, die in der Immunologie

relevant sind, können NFκB aktivieren. Der TLR (Toll-like receptor), IL-1R (IL-1 Rezeptor) und Rezeptoren der Antigen-Rezeptorfamilie gehören dazu (Hayden & Ghosh 2014). Die Degradation der IκB Proteine geschieht einleitend durch die Phosphorylierung durch den Kinasekomplex ("IκB kinases"). Dieser besteht aus der nicht-regulatorischen Untereinheit IKKα oder IKKβ und ihrer gebundenen regulatorischen Untereinheit NEMO (NFκB essential modulator), auch IKKγ genannt, der 700 - 900 kDa groß und im Zytoplasma lokalisiert ist (Hayden and Gosh 2014). NEMO ist dabei ein unerlässlicher Faktor, um den klassischen NFκB Signalweg zu aktivieren, da die Phosphorylierung der IκB Proteine von NEMO abhängig ist (Polley et al. 2013). Die Aktivierung des IKK Komplex geschieht sehr schnell binnen weniger Minuten (Blackwell et al. 2013). Ein weiteres essentielles Protein bei der Aktivierung des klassischen NFκB Signalweges ist RIP1 (Repreceptor-interacting protein 1) (Ting et al. 1996). Es vermittelt die Rekrutierung des IKK Komplex an den TNFR1 Rezeptor durch direktes Binden von NEMO (Zhang et al. 2000). RIP1 defiziente Zellen sind in ihrer NFκB Aktivierung sehr beeinträchtigt (Kelliher et al. 1998). Darüber hinaus konnten Proteine identifiziert werden, die NEMO binden und so eine verstärkende bzw. inhibierende Wirkung auf die IKK Aktivität nehmen. Die Interaktionen solcher Proteine mit NEMO wird als ein alternativer Angriffspunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Substanzen diskutiert (Chu et al. 2014). Da eine Fehlregulation von NFκB verantwortlich für die Tumorentstehung sein kann, wären solche molekularen Inhibitoren von großem Nutzen. Es konnten bereits einige kleine Moleküle entdeckt werden, die die Aktivierung von NFκB auf verschiedene Weise hemmen (Gupta et al. 2010). Die IκB Kinase ε (IKKε) könnte ebenfalls ein neues therapeutisches Target darstellen. da sie nicht nur in der Immunantwort sondern auch in der Zellproliferation und Zelltransformation mitwirkt und als ein Onkogen klassifiziert wurde (Verhelst et al. 2013). Noch weniger erforscht sind die Signalwege, die nach einem DNA-Schaden infolge genotoxischer Substanzen im Zellkern initiiert werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch solche nukleäre Signalwege bestehen, die in der Krebsentstehung von Bedeutung sind. ATM (ataxia telangeictasia mutated), eine Kinase die aufgrund eines DNA-Schadens aktiviert werden kann, und auch NEMO nehmen in einem solchen Weg eine zentrale Rolle ein (Miyamoto 2011).

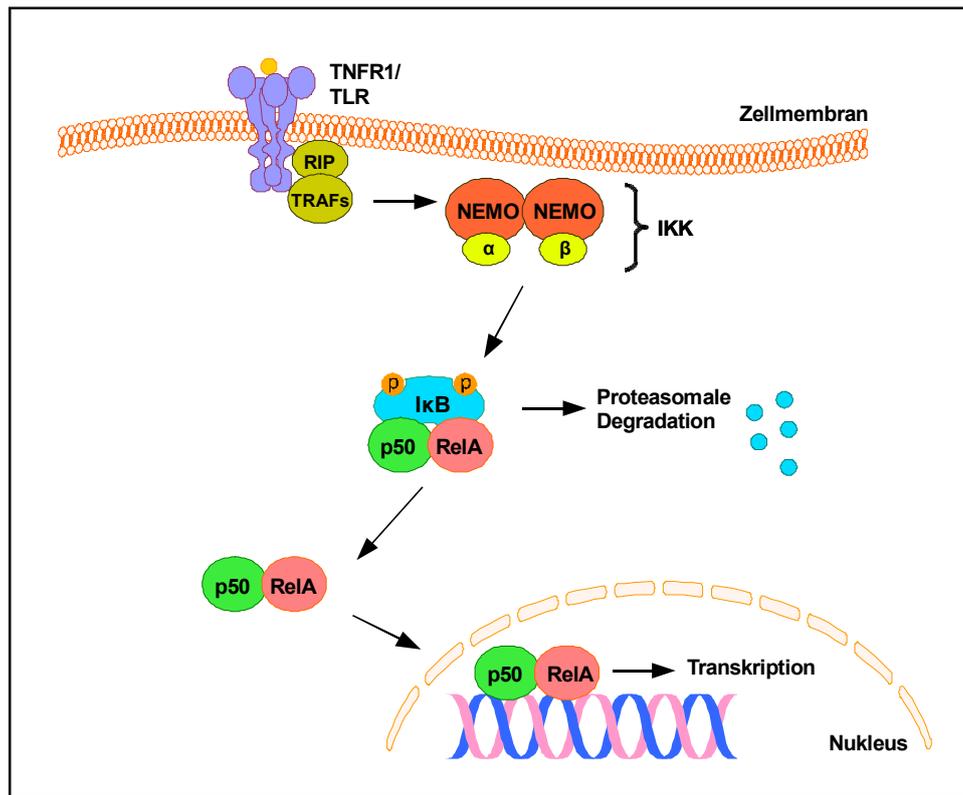


Abb.4: Der klassische NFκB-Signalweg

Nach Bindung des Liganden an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 oder den Toll-like Rezeptor kommt es zur Bindung von RIP und TRAF an der cytoplasmatischen Domäne. Diese Adapterproteine rekrutieren weiterhin den IKK Komplex, bestehend aus zwei regulatorischen Proteinen NEMO und den katalytischen Untereinheiten α und β . IκB wird dann durch IKK phosphoryliert und ubiquitiniert was zur proteasomalen Degradation führt. Der Transkriptionsfaktor NFκB, der sich aus p50 und RelA zusammensetzt, kann dann in den Zellkern translozieren und die Targetgene regulieren (modifiziert nach Gilmore, 2006).

1.4.2 Der alternative NFκB Signalweg

Im Gegensatz zu dem klassischen NFκB Signalweg ist die Aktivierung von NFκB im alternativen - oder auch nicht-kanonischen - NFκB Signalweg NEMO-unabhängig. Zentrale Rolle nimmt hier NIK (NFκB inducing kinase) ein, eine MAP3-Kinase (mitogen-associated protein 3 kinase). Nach Rezeptoraktivierung durch Signale wie z.B. CD40 oder BAFF (B-cell activating factor) kommt es zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung eines IKK Komplexes, der jedoch nur aus zwei IKK α Einheiten besteht. Dies ist ein weiterer Unterschied zum klassischen NFκB Weg, dessen IKK Komplex neben IKK α auch IKK β sowie NEMO besteht. Der IKK α Komplex wiederum phosphoryliert p100, was zur partiellen Proteolyse und damit zur Bildung des p52/RelB Komplexes führt. Dieser transloziert folglich in den Nukleus und reguliert die

Targetgenexpression (Gilmore, 2006). NIK konnte dabei als essentieller Faktor für die Prozessierung von p100 ausgemacht werden (Xiao et al. 2001). Der alternative NF κ B Signalweg spielt bei der Bildung des lymphatischen Systems, der Differenzierung von thymischen epithelialen Zellen oder der Reifung und des Überlebens von B-Zellen eine Rolle (Sun 2011).

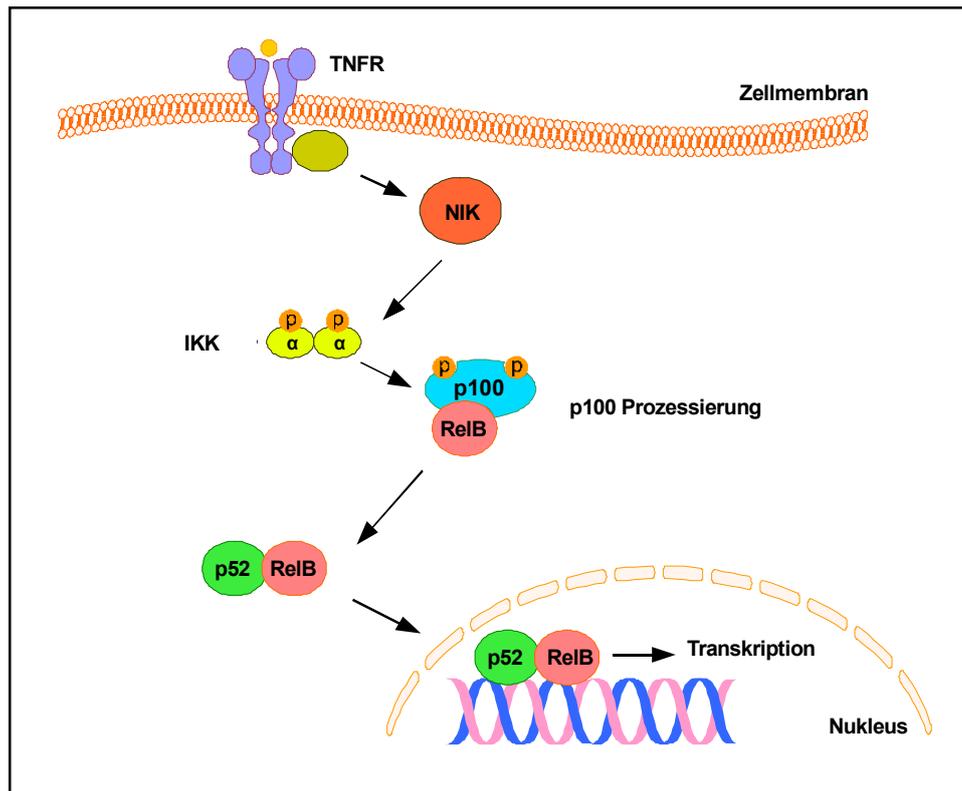


Abb. 5: Der alternative NF κ B-Signalweg

Der alternative NF κ B-Weg, der größtenteils bei der Entwicklung von B-Zellen und T-Zellen eine Rolle einnimmt, unterscheidet sich hinsichtlich der Abwesenheit von NEMO innerhalb des IKK Komplexes. Zunächst kommt es zur Bindung spezifischer Liganden wie Lymphotoxin B, CD40 oder BAFF (B-cell activating factor) an den TNF Rezeptor, was zur Aktivierung der NF κ B-induzierenden Kinase NIK führt, die den IKK α Komplex durch Phosphorylierung aktiviert. Dies wiederum hat die Freisetzung von RelB zur Folge. Nun kann p52/RelB in den Nukleus translozieren und die Transkription der NF κ B Zielgene aktivieren (modifiziert nach Gilmore, 2006).

1.5 Caspasen als molekulare Regulatoren der Apoptose

Eine wesentliche Rolle bei der Initiierung und Ausführung der Apoptose-Kaskade spielen Caspasen. Sie gehören der Familie der Cystein-abhängigen Aspartat-spezifische Proteasen ("cysteine-dependent aspartate-directed proteases") an und gliedern sich in Initiator- und Effektorcaspasen. Während Initiatorcaspasen als Monomere vorliegen, die erst durch Dimerisierung aktiviert werden, liegen Effektorcaspasen bereits als dimere Zymogene vor, die durch Prozessierung seitens der aktivierten Initiatorcaspasen vollständig aktiviert werden (MacKenzie and Clark 2012). Caspase-8 und -9 gehören dabei zu den Initiatorcaspasen, Caspase-3, -6 und -7 zu den Effektorcaspasen, die verantwortlich für die Spaltung verschiedener Proteine sind, die innerhalb des Zelltodes von Bedeutung sind (Boatright and Salvesen 2003; Nicholson 1999). Die Caspase-1, auch als Protease ICE (Interleukin-1-converting enzyme) bekannt, ist die erste humane Caspase, die identifiziert wurde. Ein Zusammenhang der Caspasen mit der Apoptose konnte jedoch erstmalig 1993 durch Untersuchungen an dem Fadenwurm *Caenorhabditis Elegans* hergestellt werden (Yuan et al. 1993). Bis heute konnten 13 humane Caspasen identifiziert werden (www.genenames.org). Caspasen bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer großen Untereinheit von ca. 20 kDa, sowie einer kleinen Untereinheit von ca. 10 kDa (Thornberry and Lazebnik 1998). Abhängig von der Struktur und Funktion der Prodomäne kann man Caspasen in drei Gruppen einteilen: ist eine große Prodomäne enthalten, teilt man sie in die sogenannten inflammatorischen Caspasen (Gruppe I) und in die Initiatorcaspasen der Apoptose auf (Gruppe II). Die Caspasen mit kleiner Prodomäne werden als Effektorcaspasen bezeichnet (Gruppe III). Die größeren Prodomänen der Procaspasen besitzen sogenannte Todesrezeptordomänen (DD: death domain), Todeseffektordomänen (DED: death effector domain) und eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD: Caspase recruitment domain) (Fesik 2000). DED's sowie CARD sind für die Rekrutierung von Initiatorcaspasen an entsprechende Signalkomplexe verantwortlich. Daraus resultiert dann die autoproteolytische Aktivierung mit folgender Einleitung der Apoptose. Caspasen selbst werden auf unterschiedlichen Ebenen reguliert: beispielsweise durch Inhibierung der enzymatischen Aktivität oder auch durch Blockade der Caspasenaktivierung am DISC-Komplex (death receptor inducing signaling complex). c-Flip ist hierfür bekannt: es besitzt zwei N-terminale DED's, die ihm die Rekrutierung am DISC

ermöglichen (Golks et al. 2005). Durch diese Blockade wird die Bindung der Caspase-8 am DISC verhindert, was somit eine Inhibierung der extrinsischen Apoptose durch Caspase-8 zur Folge hat. Eine größere Familie von Caspase-Inhibitoren mit acht humanen Mitgliedern stellen die IAP's (Inhibitor of apoptosis proteins) dar mit XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und ML-IAP als einige bekannte Vertreter (Ashhab et al. 2001; Deveraux and Reed 1999; Vucic et al. 2000). Durch sie können die Initiatorcaspase-9 sowie die Effektorcaspasen- 3 und -7 inhibiert werden. Die BIR Domänen (baculoviral IAP repeat) der IAP's, sowie die Linkerregionen zwischen den BIR ist dabei verantwortlich für die Interaktion mit den Caspasen (Srinivasula et al. 2001). Smac/DIABLO, ausgeschüttet aus Mitochondrien, reguliert wiederum die Aktivität der IAP's (Du et al. 2000; Ekert et al. 2001). Ein anderer, ähnlicher mitochondrialer Regulator ist die Serinprotease Omi/HtrA2 (Suzuki et al. 2001). Die Tatsache, dass Caspasen spezifisch verschiedene Proteine spalten bzw. Substrate prozessieren, die in der Apoptose und in inflammatorischen Prozessen von zentraler Bedeutung sind, machen sie zu potentiellen Targets für die Entwicklung neuer Therapien gegen Krebs, Autoimmun- und degenerativen Erkrankungen.

1.5.1 Die Caspase-2: eine ungelöste Frage

Obwohl die Caspase-2 eine der ersten entdeckten Caspasen war, die als Homologe zu dem *Caenorhabditis elegans* CED-3 Gen zugeordnet werden konnten, welches bei dem Zelltod von zentraler Bedeutung ist, ist die Funktion der Caspase-2 immer noch unklar (Kumar et al. 1994). Sie ist die evolutionär älteste Caspase, die höchst konserviert vorliegt (Kumar, Kinoshita, Noda, Copeland, & Jenkins 1994). Die Vorstufe sowie die prozessierte Form der Caspase-2 sind im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. Allerdings ist sie im Gegensatz zu anderen Caspasen die Einzige, die konstitutiv im Zellkern lokalisiert ist. Die nukleäre Lokalisation ist dabei abhängig von der Prodomäne und lässt eine weitere Funktion bei Transportwegen in den Zellkern vermuten (Colussi et al. 1998). Da die Caspase-2 in monomerer Form vorliegt, die erst durch Dimerisierung aktiviert wird, könnte es sich um eine Initiatorcaspase handeln (Baliga et al. 2004). Außerdem wurde eine Caspase-2 aktivierende Plattform beschrieben, die unabhängig von Cytochrom c und Apaf-1 die Aktivierung der Caspase-2 vermittelt (Read et al.

2002). Es wird angenommen, dass die Aktivierung der Caspasen nach Apoptose-Induktion vornehmlich über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird. Dabei kommt es zur Cytochrom c Ausschüttung durch das Mitochondrium was die Formation des Apaf-1 Komplexes und folglich die Rekrutierung und Aktivierung der Caspase-9 zur Folge hat. Es gibt jedoch Daten, die eine essentielle Rolle der Caspase-9 für die Caspase-2 Aktivierung zeigen sowie für die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials zeigen (Samraj et al. 2007). Daneben existieren Hinweise, dass die Caspase-9 nicht wie angenommen als Initiatorcaspase fungiert, da die Caspase-2 für die Freisetzung von Cytochrom c benötigt wird und noch oberhalb dieses Signalweges eine bedeutende Rolle einnehmen könnte (Lassus et al. 2002; Robertson et al. 2002). Diese Daten zeigen die Caspase-2 als eine mögliche Initiatorcaspase. Daneben zeigen andere Daten allerdings, dass Caspase-3 in der Lage ist, Caspase-2 infolge der mitochondrialen Permeabilisierung zu spalten - jedoch ohne sie zu aktivieren (Baliga, Read, & Kumar 2004; Slee et al. 1999). Darüber hinaus ist die Caspase-2 ein Interaktionspartner von PIDD (p53 inducible protein with a death domain). PIDD bildet Multiproteinkomplexe aus, die je nach Lokalisation und Interaktionspartner verschiedene Funktionen übernehmen. Dabei ist PIDD eine essentielle Komponente dieser Caspase-2 aktivierenden Plattform (Tinel and Tschopp 2004). PIDD und Caspase-2 bilden dann mit RAIDD das sogenannte RAIDD-PIDDosom. Die Rekrutierung der Caspase-2 an das Adapterproteins RAIDD findet über die CARD-Domänen, die eine Protein-Protein Interaktionsmotiv darstellt, statt (Hofmann et al. 1997). Das RAIDD-PIDDosom kann nach genotoxischen Stimuli die Apoptose induzieren (Tinel and Tschopp 2004). PIDD und Caspase-2 bilden daneben jedoch einen weiteren Komplex: das DNA-PKcs-PIDDosom, welches am G2/M-Checkpoint vermitteltem Zellzyklusarrest, sowie dem NHEJ (non-homologous-end-joining), einem DNA-Reparatur-Signalweg zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, beteiligt ist (Shi et al. 2009). Bislang ist die Caspase-2 die Einzige identifizierte Caspase mit einem nukleärem Lokalisationssignal (NLS) innerhalb der Prodomäne (Baliga et al. 2003). Auch wenn Caspase-2 durch PIDD aktiviert ist, können die Zellen überleben. Für die Ausführung der Apoptose ist letztendlich ein zweites Signal nötig (Tinel & Tschopp 2004). Neben der Aktivierung von proapoptotischen Signalwegen kommt es ebenfalls zur Aktivierung von Zellüberlebenssignalwegen. Einer davon ist der NFκB Weg, der durch das NEMO-PIDDosom

aktiviert werden kann (s. Kapitel 1.6.1.2). Je nach Ausmaß des Schadens der DNA wird dann RAIDD und Caspase-2 verstärkt rekrutiert und die Apoptose eingeleitet. Ferner zeigte sich die Caspase-2 als ein Protein, welches Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl2 Familie, spalten kann (Guo et al. 2002). Dies unterstützt die Annahme Caspase-2 könne eine Initiatorcaspase darstellen, da die Spaltung von Bid die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zur Folge hat, was in die Apoptose mündet. Jedoch ist die Effizienz der Caspase-2 bei dieser Spaltung im Vergleich zur Caspase-8, die ebenfalls den mitochondrialen Signalweg durch Bid-Spaltung aktiviert, mit ein Viertel der Leistung sehr gering (Bonzon et al. 2006). Dennoch gilt es als eine ungelöste Frage, ob die Apoptose die funktionelle Hauptaufgabe der Caspase-2 ist. Der Verlust der Caspase-2 geht einher mit verminderten Antwort der Zelle auf DNA-Schaden, eine schwach erhöhte Proliferationsrate, beruhend auf Störungen in der Zellzyklusregulation sowie genomischer Instabilität (Dorstyn et al. 2012; Ho et al. 2009). Dies wiederum impliziert die Caspase-2 als einen möglichen Kandidaten für ein weiteres Tumorsuppressorgen. Unterstützt wird diese These auch durch Beobachtungen von Manzl et al.: hiernach konnte eine Tumorsuppressorfunktion von Caspase-2 als Reaktion auf eine aberrante Expression des Onkogens c-Myc beobachtet werden, die unabhängig von PIDD, Bid oder TRAIL zu sein scheint, sondern mit einem Funktionsverlust von p53 und einer Streuung des Tumors einhergehen (Manzl et al. 2012). Auch andere Studien bestätigen dies. So zeigten Caspase-2^{-/-} MEFs (mouse embryonic fibroblasts) eine erhöhte Proliferationsrate, Apoptoseresistenzen gegenüber Chemotherapeutika sowie einer fehlerhaften Zellzyklusregulation, so dass die Zellen eine erhöhte Bereitschaft zur Malignität entwickeln (Ho et al., 2009). Interessanterweise zeigten Caspase-2 defiziente Mäuse phänotypisch einen rascheren Alterungsprozess (Zhang et al. 2007). In Eierstockkarzinomzellen konnte der Caspase-2 zudem eine regulierende Rolle in der Nekroptose zugewiesen werden (Zamaraev et al., 2018). Demnach führte die Hemmung der Caspase-2 zu einer verringerten Nekroptoserate. Auch bei viralen oder bakteriellen Infektion kommt ihr eine Beteiligung zu: so erleichtert die Caspase-2 den Zelltod der Wirtszelle (zusammengefasst in Miles et al., 2017). Die Caspase-2 scheint somit die verschiedensten Aufgaben in der Zelle zu übernehmen, die nicht ausschließlich mit dem Zelltod verbunden sind.

1.6 PIDD als ein molekularer Schalter zwischen Apoptose und NFκB

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist wie bereits erwähnt für den Eintritt der Zelle in Zellzyklusarrest und Apoptose von enormer Bedeutung. Im Jahr 2000 konnte Lin ein Gen identifizieren, welches von p53 reguliert wird (Lin et al. 2000). Das 910 Aminosäuren lange Genprodukt wurde davon ableitend als PIDD bezeichnet (p53 inducible protein with a death domain). Anhand der PIDD cDNA aus der Maus konnte die p53-Konsensus-Bindesequenz identifiziert werden, die der PIDD-kodierenden Region vorangeschaltet ist. Lokalisiert ist PIDD auf Chromosom 11p15.5 des Menschen, und zeigt seine stärkste Expression in der Milz und der Niere (Janssens and Tinel 2012). In der Studie von Lin konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein Anstieg der PIDD RNA als Folge ionisierender Bestrahlung in Abhängigkeit von p53 zu verzeichnen ist. Außerdem führte eine Überexpression von PIDD zur Induktion der Apoptose, während eine Antisense Inhibierung von PIDD die p53-vermittelte Apoptose abschwächte, so dass PIDD als ein Effektor der p53-abhängigen Apoptose möglich erscheint (Lin et al., 2000). Eine verringerte Expression von PIDD in HEP-G2 Zellen könnte das Fortschreiten des Zellzyklus erleichtern, sowie die Zellproliferation beschleunigen, während eine Überexpression hingegen zu einem Arrest in der G1-Phase führt und die Zellproliferation verhindert (Shi et al., 2016). Die Struktur von PIDD ähnelt darüber hinaus anderen Molekülen, die Caspasen aktivieren wie beispielsweise Apaf-1, aber auch Mitgliedern der Ankyrin-Familie, die ebenfalls eine C-terminale Todesdomäne (DD: death domain) besitzen und inhibierend auf NFκB wirken (Janssens and Tinel, 2012). PIDD bildet die Hauptkomponente drei verschiedener PIDDosomen-Komplexe, die je nach Interaktionspartner und zellulärer Lokalisation verschiedene Funktionen übernehmen, und im folgenden Kapitel expliziter vorgestellt werden. Darüber hinaus wird PIDD konstitutiv gespalten in ein N-terminales Fragment, PIDD-N (48 kDa), und zwei C-terminale Fragmente, PIDD-C (55 kDa) und PIDD-CC (37 kDa). Diese autoproteolytische Spaltung bestimmt im Weiteren die downstream vermittelten Signalkaskaden: So ist PIDD-C in der Lage NFκB zu aktivieren durch Rekrutierung von RIP und NEMO, während PIDD-CC durch Caspase-2 Aktivierung hingegen in die Apoptose mündet (Tinel et al. 2007). Bis heute konnten vier Isoformen von PIDD identifiziert werden, die ebenfalls verschiedene Funktionen besitzen und das System noch komplexer machen. Die Isoformen werden in Kapitel 1.6.2 genauer vorgestellt. Welche Hauptfunktion PIDD hat, ob es

mehr an der Apoptose beteiligt ist als an der Vermittlung des Zellzyklusarrest und der DNA-Reparatur, ob es grundsätzlich an der Caspase-2 Aktivierung in vivo beteiligt ist und welche molekularen Aktivatoren es gibt, bleiben bis heute offene Fragen. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass das renale Zellkarzinom eine signifikant erhöhte Expression aufweist (Heikaus et al. 2010).

1.6.1 PIDDosomen Mitglieder

1.6.1.1 Das RAIDD-PIDDosom: PIDD und die Apoptose

Das cytoplasmatisch lokalisierte RAIDD-PIDDosom - auch Caspase-2 PIDDosom genannt - ist ein 700 kDa großer, proapoptotischer Proteinkomplex, der sich aus PIDD, RAIDD (Receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain) und Caspase-2 zusammensetzt. Die Interaktion zwischen PIDD und RAIDD, einem bekannten Caspase-2 CARD Interaktionspartner konnte erstmals von Tinel und Tschopp gezeigt werden (Jang and Park 2013; Tinel & Tschopp 2004). Damit stellt dieser Komplex eine Plattform der Caspase-2 Aktivierung dar. Als effektive Stimulatoren zeigten sich Hitze und initiiertes DNA-Schaden, um das RAIDD-PIDDosom zu aktivieren, woraufhin PIDD sowohl RAIDD als auch Caspase-2 rekrutiert Tinel & Tschopp 2004; (Bouchier-Hayes et al. 2009; Tinel et al. 2011; Tu et al. 2006). Wie bereits beschrieben wird PIDD autoproteolytisch gespalten. PIDD-CC erwies sich mittels Immunopräzipitation von RAIDD als das Hauptprotein der Caspase-2 Aktivierung, obwohl auch PIDD-C eine Death Domain enthält, die eine Interaktion mit RAIDD ermöglichen würde (Tinel et al. 2007). Dennoch ist die Rolle von PIDD in der Apoptose unklar und kontrovers diskutiert: so mündet in einigen Zelltypen die PIDD-vermittelte Caspase-2 Aktivierung im Zelltod, während andere Zellen lediglich eine verminderte Teilungsrate mit einhergehender Sensibilisierung zur Apoptose zeigten (Lin et al. 2000; Tinel & Tschopp 2004; Baptiste-Okoh et al. 2008; Berube et al. 2005). Nicht veröffentlichte Versuche von Tinel zeigen, dass aktive Caspase-2 die Wirkung proapoptotischer Reagenzien potenziert, ebenso wie HeLa Zellen, die PIDD exprimieren auch eine verstärkte Cytochrom c Ausschüttung zeigen, die zur Aktivierung der Caspase-9 und -3 führen (zusammengefasst in Janssens and Tinel, 2012).

Dagegen konnte die Rolle von PIDD in der Caspase-2 abhängigen Apoptose in anderen Versuchen mit Mäusen, die defizient für PIDD bzw. RAIDD waren, nicht beobachtet werden (Kim et al. 2009; Manzl et al. 2009). Hier zeigte sich eine Caspase-2 Aktivierung in RAIDD ^{-/-} Mäusen mit einhergehender Apoptose, die die Rolle von RAIDD als Adaptermolekül in Frage stellen. PIDD ^{-/-} Mäusen wiesen ebenfalls keine Beteiligung von PIDD in der Caspase-2 Aktivierung auf. Weitere Untersuchungen zeigen dass Caspase-2 und PIDD auch unabhängig von RAIDD tumormodulierende Eigenschaften besitzen (Peintner et al. 2015). Für diese unterschiedlichen Beobachtungen die die Funktion von PIDD und RAIDD für die Caspase-2 Aktivierung mit folgender Apoptose anzweifeln, könnte das Level der PIDD Aktivierung bzw. des DNA-Schadens eine entscheidende Rolle, aber auch die Existenz einer weiteren Plattform der Caspase-2 Aktivierung eine Erklärung sein, die unabhängig von PIDD und RAIDD ist (Janssens & Tinel 2012). Unter welchen Umständen dabei das RAIDD-PIDDosom an der Caspase-2 Aktivierung beteiligt ist, werden zukünftige Untersuchungen erst zeigen müssen.

1.6.1.2 Das NEMO-PIDDosom: PIDD und die NFκB-Aktivierung

Neben der Fähigkeit von PIDD-CC innerhalb des RAIDD-PIDDosoms Apoptose auszulösen, kann das Spaltprodukt PIDD-C direkt über seine DD mit RIP1 interagieren, welches im Weiteren die Interaktion mit NEMO vermittelt (Janssens et al. 2005). Dieser Komplex wird als NEMO-PIDDosom bezeichnet, ist im Nukleus lokalisiert, und macht die Funktion von PIDD als molekularen Schalter zwischen Apoptose und Zellüberleben deutlich: Sowohl RIP1 als auch NEMO sind Teil der DNA-Schaden induzierten NFκB-Aktivierung (Huang et al. 2000; Huang et al. 2003; Hur et al. 2003). PIDD transloziert nach Auslösen von genotoxischem Stress in den Nukleus, bildet mit RIP1 und NEMO das sogenannte NEMO-PIDDosom und ermöglicht die Sumoylierung von NEMO, was im Folgenden die Erkennung durch die nukleare Kinase ATM ermöglicht die für die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von NEMO von Bedeutung ist (Janssens et al. 2005; Huang, Wuerzberger-Davis et al. 2003). Dadurch wiederum kann NEMO in das Zytosol exportiert werden, wo es letztendlich den IKK Komplex und damit NFκB aktivieren kann (s. 1.6.1.2). Die Fähigkeit von PIDD, das Zellschicksal zu bestimmen - durch Interaktion mit RAIDD und Caspase-2 die Apoptose oder im Komplex mit NEMO und RIP1 das

Zellüberleben auszulösen - hängt dabei von der Phosphorylierung von PIDD innerhalb der DD an Threonin 788 ab. Diese Phosphorylierung, durch ATM gesteuert, ist nötig für die Bindung von RAIDD an PIDD. Im Gegensatz dazu kommt es nicht zur RAIDD Bindung mit folgender Caspase-2 Aktivierung und der Apoptose, wenn die Phosphorylierung unterbleibt. In diesem Fall interagiert RIP1 mit PIDD und der NFκB-Weg wird aktiviert (Ando et al. 2012). In diesem Zusammenhang stellt ATM eine wichtige Funktion dar, zwischen Tod und Überleben der Zelle zu entscheiden.

1.6.1.3 Das DNA-PKcs-PIDDosom: PIDD, der Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur

PIDD und Caspase-2 sind nicht nur an der Apoptose beteiligt, sondern auch an Zellzykluskontrolle, Tumorprogression und DNA-Reparatur. Zusammen mit der katalytischen Untereinheit DNA-PK (eine nukleäre Serin/Threonin Protein Kinase) bilden sie das sogenannte DNA-PKcs-PIDDosom (Logette et al. 2011; Shi et al. 2009). Dieser Komplex ist an dem NHEJ-Pathway (non-homologous end-joining), ein Signalweg der DNA-Reparatur, beteiligt (zusammengefasst in Janssens and Tinel, 2012). Welcher Signalweg letztendlich überwiegt, hängt möglicherweise mit dem Ausmaß des DNA-Schadens zusammen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Caspase-2 und PIDD an einem DNA-Schaden induzierten Zellzyklus-Checkpoint involviert sind, ebenso wie die Rolle von PIDD beim Wachstumsarrest, abhängig von Caspase-2 und p53 (Janssens and Tinel, 2012; Oliver et al. 2011). Ursprünglich wurde ein Zusammenhang zwischen der signifikant erhöhten Expression von PIDD im RCC, welches charakteristischerweise Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika aufweist, mit dem DNA-PKcs-PIDDosom vermutet (Heikaus et al., 2010; Logette et al., 2011), allerdings stellte sich heraus, dass PIDD-CC für die Resistenz gegenüber Cisplatin verantwortlich ist, und nicht PIDD-C, welches die Hauptkomponente dieses Komplexes ist (Logette et al., 2011). Möglicherweise induziert p53, welches durch PIDD und Caspase-2 stabilisiert wird, hier vornehmlich Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, mehr als Apoptose, was die Resistenz erklären könnte. Die Inhibierung von PIDD war assoziiert mit einer erhöhten Apoptoserate nach UV-Behandlung der Zellen, und auch die Dosis des Chemotherapeutikums Doxorubicin war geringer die zur Apoptose führte (Oliver et al. 2010). Dies bestärkt den Verdacht, dass PIDD

und Caspase-2 bei einem mäßigen DNA-Schaden für dessen Reparatur mehr von Bedeutung sind als für die Apoptose. Die zahlreichen Studien, die die Aktivierung der Apoptose nach DNA-Schaden durch PIDD und Caspase-2 zeigen konnten, beruhen möglicherweise auf der Überexpression von PIDD und Caspase-2 bzw. einen irreparablen DNA-Schaden.

1.6.2 Isoformen von PIDD und ihre funktionellen Unterschiede

Neben der funktionellen Regulation von PIDD durch autoproteolytische Spaltung wird PIDD außerdem alternativ gespleißt. Die daraus resultierenden Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer pro- bzw. antiapoptotischer Wirkung und haben damit eine wichtige Bedeutung für das Zellschicksal nach DNA-Schädigung. 2011 konnte neben den drei bislang bekannten Isoformen, PIDD-1, -2 und -3, eine weitere alternative Spleißvariante, PIDD-4 identifiziert werden, deren Hauptlokalisierung im Zytoplasma ist (Huang et al. 2011): Die drei Isoformen PIDD-1, -2 sowie -3 können NFκB nach genotoxischem Stress aktivieren, während PIDD-4 bislang ausschließlich eine proapoptotische Rolle zugeordnet werden konnte. Auch PIDD-1 kommt neben seiner Fähigkeit NFκB zu aktivieren als Mitglied des RAIDD-PIDDosoms eine proapoptotische Funktion zu, während die Isoformen PIDD-2 und PIDD-3 hingegen keine Apoptose induzieren können (Cuenin et al. 2008; Pick et al. 2006). Damit stellt vor allem die PIDD-1 die Isoform dar, die die Rolle eines molekularen Schalters einnehmen könnte, der über den apoptotischen Tod oder das Überleben der Zelle entscheidet (Cuenin, Tinel, Janssens, & Tschopp 2008; Janssens et al. 2005; Telliez et al. 2000; Tinel et al. 2007). PIDD-2 wirkt als Gegenspieler von PIDD-1, indem es die durch PIDD-1 induzierte Apoptose inhibiert. Demgegenüber ist PIDD-3 zwar in der Lage, das autoproteolytische Fragment PIDD-CC zu bilden, hat aber lediglich eine unterstützende proapoptotische Wirkung und kann nicht unabhängig von PIDD-1 Apoptose induzieren. Die letzte identifizierte Variante PIDD-4 schließlich bildet einen größeren Anteil des PIDD-CC Fragments als PIDD-1 und kann so unabhängig von der Expression der anderen Isoformen die Apoptose begünstigen (Huang et al. 2011). PIDD-1 wurde ursprünglich als p53-induzierbares Protein identifiziert und lässt sich darüber hinaus durch Apoptose Stimuli regulieren (Lin et al. 2000). Auch die Expression der Spleißvariante PIDD-4 wird über p53 reguliert (Huang et al. 2011). Das basale Expressionslevel

von PIDD ist jedoch unabhängig von p53 (Oliver, T.G., Mercer, K.L., Sayles, 2010). Darüber hinaus konnten einige Zytostatika einzelne PIDD-Isoformen aber auch über einen anderen, p53-unabhängigen Weg, regulieren: So wurde PIDD-3 p53-unabhängig durch den Topoisomerase II Hemmer Etoposid induziert, während es bei PIDD-1 und -2 zu keinen Änderungen der Expressionslevel kam (Cuenin et al. 2008). So sind PIDD und Caspase-2 nicht nur bedeutende Faktoren, die die Apoptose begünstigen, sondern auch an Signalwegen der DNA-Reparatur beteiligt. Dabei ist jedoch noch weitgehend unklar, ob PIDD eine bedeutendere Rolle beim Zellzyklusarrest bzw. bei der DNA-Reparatur zukommt als bei der Apoptose und inwieweit die Expression von PIDD und seinen Isoformen und Spaltprodukten in Nierenzellkarzinomen zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen.

2. Zielsetzung

Nierenzellkarzinome zeichnen sich bekanntermaßen durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aus. Die Signalwege, die zum Zelltod führen, sind bislang nur unzureichend verstanden. Mögliche Kandidaten, denen in solchen Signalkaskaden eine Bedeutung zukommen könnte, stellen Caspase-2 und PIDD dar.

Caspase-2 und PIDD bilden Multiproteinkomplexe, die je nach subzellulärer Lokalisation und Interaktion verschiedene Funktionen ausüben können. Während die genaue Rolle der Caspase-2 noch weitestgehend unklar ist, ist bekannt, dass PIDD als ein molekularer Schalter zwischen Apoptose, dem programmiertem Selbstmordprogramm einer Zelle, und dem NFκB-Signalweg, ein Zellüberlebenssignalweg, fungieren kann. Dysregulationen oder Defekte innerhalb der Apoptose können ursächlich oder verstärkend zur Entstehung von Tumoren aber auch anderer Krankheiten wie neurodegenerative Leiden oder AIDS beitragen. Darüber hinaus kann eine fehlerhafte Regulation der Apoptose ursächlich für Resistenzen gegenüber Chemotherapien sein, da die eingesetzten Substanzen über eine Induktion von proapoptotischen Prozessen wirken. Das Verständnis dieses in der Evolution hoch konservierten und regulierten Ereignisses der Apoptose, aber auch der Zellüberlebenssignalwege, ist daher von großer Bedeutung und kann zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

Während Caspase-2 und PIDD im Zytoplasma zusammen mit RAIDD das sog. RAIDD-PIDDosom formen, das an den apoptotischen Signalwegen beteiligt ist, bilden sie im Nukleus der Zelle zusammen mit DNA-PKcs das sog. DNA-PKcs-PIDDosom, das am G2/M Arrest und am „Non-homologous end joining“ (NHEJ) partizipiert (Tinel and Tschopp, 2004; Shi et al. 2009). Darüber hinaus kann das 51 kDa schwere C-terminale Fragment von PIDD (PIDD-C), das durch Autoproteolyse entsteht, in Interaktion mit RIP1 und NEMO, den antiapoptotischen NFκB-Signalweg aktivieren (Tinel et al., 2007; Janssens et al., 2005; Hur et al. 2003; Huang et al. 2000 + 2003).

Auch die vier bislang identifizierten PIDD Isoformen mit teils pro-, teils antiapoptotischer Funktion vergrößern die Komplexität dieses Systems. Schließlich ist die Rolle von Caspase-2

als Initiator- bzw. Effektor-Caspase noch nicht abschließend geklärt: sie scheint je nach zellulärem Kontext zu variieren.

Allerdings ist die Caspase-2 die erste der Caspasen, die in der Zytostatika-induzierten Apoptose in Nierenzellkarzinomen aktiviert wird.

Das Ziel dieses Vorhabens besteht deshalb darin, die Rolle von Caspase-2 und PIDD für die Apoptose, die Zellzykluskontrolle und die Induktion des NFκB-Signalweges in Nierenzellkarzinomen, die bekanntermaßen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Zytostatika aufweisen, wie folgt, zu analysieren:

- Wie sind die Mitglieder der drei PIDDosomen Komplexe in Nierenzellkarzinomzellen exprimiert und gibt es Änderungen in der Expression und zellulären Lokalisation nach Apoptose-Induktion?
- Wie sind die Isoformen von PIDD in Nierenzellkarzinomen exprimiert und gibt es Expressionsunterschiede verschiedener Tumorstadien im Vergleich zu gesunder Niere?
- Wird neben der Aktivierung Apoptose relevanter Proteine auch der NFκB-Signalweg nach Zytostatika Induktion über die PIDDosomen Komplexe in Nierenzellkarzinomzellen ausgelöst?
- Welche funktionelle Bedeutung kommt der Caspase-2 in der Aktivierung weiterer Caspasen zu und hat sie eine Rolle im Zellzyklus vermittelten G2/M-Arrest?

3. Materialien

3.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systemec (Wettenberg)
Durchflußzytometer CyFlow space	Partec (Münster)
Elektrophoresekammer	Roth (Karlsruhe)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH (Staufen)
Inkubationsschüttler INNOVA 2000	Artisan Scientific (Champaign, USA)
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Labortechnik (Staufen)
Mikroskop	Leitz / Leica (Wetzlar)
Mikrowelle Micromat	AEG (Nürnberg)
Nanodrop Photometer	PEQLAB (Erlangen)
Netzgeräte	BioRad (München)
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
PCR-Gerät: Light Cyclers	Roche (Mannheim)
pH Meter 211	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Bioscience (Fernwald)
Pipettierhilfen Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Heilbronn)
Sterilbank BSB4	Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischautoklav Typ 26	Melag (Berlin)
Video Copy Prozessor	Mitsubishi (Ratingen)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia N.Y., USA)
Vortex Genius 3	IKA-Labortechnik (Staufen)

Wasserbad	GFL® (Burgwedel)
Western Blot Anlagen	BioRad (München)/Hoefer (San Francisco)
Labofuge 400R	Heraeus Instruments (Hanau)
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech (Osterode)
Mikro 22R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Mini Spin Plus	Eppendorf (Hamburg)

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Plastik- und Einwegartikel

FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nürmbrecht)
Falcon-Tubes	Greiner (Frickenhausen)
Halbmikroküvetten	Sarstedt (Nürmbrecht)
Kapillaren für Light Cycler	Roche (Mannheim)
Kapillarspitzen	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Nitrocellulosemembran	Whatman Schleicher & Schuell (Dassel)
Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensburg)
Plastikpipetten	Welabo (Düsseldorf)
Reaktionsgefäße (1,5 - 2ml)	Eppendorf (Hamburg)
	Sarstedt (Nürmbrecht)
Sterilfilter	Sartorius (Göttingen)
Whatman-Papier	Whatman Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen	Biochrom (Berlin)/
	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkultur-Testplatten	Biochrom (Berlin)/
	TPP (Trasadingen, Schweiz)/
	Greiner (Frickenhausen)

3.2.2 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt wurden alle Chemikalien über folgende Firmen bezogen: Merck, Sigma, Roth, Glaxo, BioRad, VWR, PAA, Biochrom, Invitrogen, Gibco, Applichem, BioBudget.

3.3 Biologisches Material

- Humane Nierenzellkarzinomzelllinien: clearCa-6, clearCa-9, clearCa-12
(Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf)
- RNA aus humanen Nierenzellgewebe verschiedener Tumorstadien
(Tumorbank Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf)

3.4 Kit-Systeme

- "First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas)
- "DNase I, Rnase-free" Kit (Fermentas)
- DreamTaq DNA-Polymerase (Fermentas)
- "QuantiFast SYBR Green PCR Mastermix" (Qiagen)
- "Caspase-Staining Assays" (Promokine)
- "FlexiTube siRNA Premix" (Qiagen)

3.5 Zytostatika

Topotecan (Glaxo); Lösungsmittel: PBS [1mg/ml]

3.6 Protein- und Nukleinsäurestandards

- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder (Fermentas)
- 1kb DNA-Ladder (New England Biolabs)

3.7 Oligonukleotide

Tab.2: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' → 3')	Endkonzentration	Zusätze	Produktgröße
PIDD-1 fwd	tcc ctg gtc ctc aaa gga g	500nM	-	136bp
PIDD-1 rev	tct cca ggc tgt tga agc tc	500nM		
PIDD-2 fwd	gag ctc acc cac ctg tac tgg	50nM	-	121bp
PIDD-2 rev	gag gca tga ggt tca cac	50nM		
PIDD-3 fwd	gaa gga ggt gtg tcc ttc tac cg	500nM	1% DMSO	196bp
PIDD-3 rev	ctc ggc atc tcc cag att ca	500nM		
PIDD-4 fwd	cag gag tgt ccc agc gcc gtg	300nM	-	347bp
PIDD-4 rev	agg gct gcc act ggt gaa c	50nM		
SDHA fwd	tgg gaa caa gag ggc atc tg	500nM	-	86bp
SDHA rev	cca cca ctg cat caa att cat g	500nM		

3.8 Antikörper

Tab.3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Blockingpuffer	Größe (kDa)
Caspase-2	Cell Signaling (#2224)	1:1000	5% Milch in TBS-	48
Caspase-3	Cell Signaling (#9668)	1:1000	5% Milch in TBS-	35
Caspase-8	Cell Signaling (#9746)	1:1000	5% BSA in TBS-T	57
Caspase-9	Cell Signaling (#9502)	1:1000	5% Milch in TBS-	47
DNA-PKcs	Santa Cruz (sc-56090)	1:200	5% Milch in TBS-	460
Ph-Histon H3 (Ser10)	Milipore (05-806)	4,2µg/ml in 100µl	Für FCM	-
IκBα	Cell Signaling (#9242)	1:1000	5% BSA in TBS-T	39
Phospho-IκBα (Ser32)	Cell Signaling (#2859S)	1:1000	0,5% BSA in	40
goat anti-mouse IgG1-FITC	BioLegend (400110)	20µl/10 ⁶ Zellen in 100µl	Für FCM	-
Lamin	Cell Signaling (#4777)	1:2000	5% Milch in TBS-	74 bzw. 63
NEMO	Biozol (K0159-3)	1:10000	5% Milch in TBS-	45
PARP	Cell Signaling (#9542)	1:1000	5% Milch in TBS-	116 bzw. 89
PIDD-1	Abcam (ab78389)	1:1000	5% Milch in TBS-	90
RAIDD	Abcam (ab52621)	1:500	0,5% BSA in	23
RIP-1	Abcam (ab72139)	1:500	5% Milch in TBS-	76
GAPDH	Sigma Aldrich (G8795)	1:4000	5% Milch in TBS-	36
Tubulin	Sigma Aldrich (T5168)	1:4000	5% Milch in TBS-	50

Tab.4: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Blockingpuffer
Anti mouse IR-Dye 680cw	Licor	1:10000	5% Milch in TBS
Anti mouse IR-Dye 800cw	Licor	1:10000	5% Milch in TBS
Anti rabbit IR-Dye 680cw	Licor	1:10000	5% Milch in TBS
Anti rabbit IR-Dye 800cw	Licor	1:10000	5% Milch in TBS
Anti mouse Fluorescein Conjugate	Millipore (92590)	1:100	Für FCM Analyse

3.9 Software und Server

Microsoft Excel, Microsoft Word, GIMP, ImageJ, FloMax, LI-COR Image Studio Odyssey, Roche Light Cycler, NCBI, BLAST, Primer_3

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte bei 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Um eine klonale Selektion und eine Synchronisation der Zellen vorzubeugen sowie die Heterogenität der Zelllinien zu erhalten, wurden die Zellen konstant in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Vor der Ernte wurden die adhärennten Zellen zunächst in PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde in mindestens gleichem Volumen an Medium aufgenommen, da das im Medium enthaltene FCS das Trypsin inaktiviert. Im Anschluss wurden die Zellen je nach Zelllinie und Wachstumsrate in definierten Splittingverhältnissen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für jede Fragestellung wurden die Versuche mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Zellkulturmedium

DMEM

+ 10% FCS
+ 1% Penicillin/Streptomycin
+ 2mM L-Glutamin
+ 1% Asparagin/Arginin (Stocklsg.)
+1% HEPES, pH 7,4

Asparagin/Arginin Stocklsg.

3,6g Asparagin/L dH₂O
11,6g Arginin/L dH₂O
1:1 verdünnen, 24h rühren, sterilfiltrieren

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um einen gewissen Pool der Zelllinien zu erhalten, wurden Zellen eingefroren, so dass bei Bedarf bzw. bei höher werdenden Passagen darauf zurückgegriffen werden konnte. Dazu wurde zunächst die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt (s. Kapitel 4.1.3), um sie in einer definierten Zahl einfrieren zu können. In einem 15ml-Falcon-Röhrchen wurden die

Zellen anschließend bei 300g für 5min zentrifugiert, der entstehende Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5ml Einfriermedium (aus 90% FCS und 10% DMSO) aufgenommen, in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Um eingefrorene Zelllinien wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen unter kaltem, fließendem Wasser langsam aufgetaut, in ein 15ml-Falcon- Röhrchen überführt und mit 5ml Medium aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde bei 300g und Raumtemperatur für 5min zentrifugiert, der anfallende Überstand verworfen und das Pellet erneut in 5ml Medium resuspendiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Eine weitere Zentrifugation erfolgte wie zuvor beschrieben, wobei das Pellet nun in 3ml Medium aufgenommen wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend je nach Zelllinie in 6-Well Platten bzw. bei schneller wachsenden Zelllinien direkt in T25-Flaschen ausgesät.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellen wurden mit Hilfe von sogenannten Neubauer-Zählkammern unter einem Mikroskop gezählt. Dafür wurde ein Aliquot der Zellsuspension (nach Trypsinierung) mit Trypanblau versetzt und unter das Deckgläschen der Zählkammer gegeben. Da Trypanblau nur die Membranen toter Zellen durchdringt, erscheinen lebende Zellen weiß, während tote Zellen blau angefärbt sind. Gezählt wurden die lebenden Zellen innerhalb der vier Großquadrate, um davon einen Mittelwert zu bilden, der mit dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert wurde. Unter Berücksichtigung der Verdünnung erhält man so die Zellzahl pro ml.

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

4.1.4 Zytostatika Behandlungen

Je nach Fragestellung wurden die Zellen mit dem Zytostatika Topotecan (Handelsname Hycamtin) behandelt. Die Zellen wiesen zum Zeitpunkt der Behandlung 40 - 60% Konfluenz auf und befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Bei der Ernte wurde stets der Überstand mitgenommen und abzentrifugiert, da dieser apoptotische Zellen enthielt. Das Topotecan wurde zuvor in sterilem PBS gelöst [$1\mu\text{g}/\mu\text{l}$]. Die eingesetzte Endkonzentration wurde spezifisch für die jeweilige Zelllinie hinsichtlich ihrer Resistenz gewählt und wird im Ergebnisteil vorgestellt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Transienter Knockdown mittels siRNA

Um der Fragestellung der Funktionen und möglichem Zusammenwirken der Caspase-2, PIDD und p53 innerhalb der Apoptose, bzw. der Zellzykluskontrolle nachzugehen, wurden die Nierenzellkarzinomzelllinien mit siRNA behandelt. Die verwendete siRNA wurde als Premix von Qiagen bezogen und laut Herstellerangaben eingesetzt. Das lyophilisierte Pellet enthält nicht nur die siRNA, sondern auch das Transfektionsreagenz. Dieser Mix wurde in $625\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser steril gelöst und 45min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei zwischenzeitlich 3-4 Mal invertiert bzw. gevortext wurde. Pro Well wurde am Folgetag der Aussaat je $41,6\mu\text{l}$ des siRNA Premix tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Platte vorsichtig geschwenkt. Das Gesamtvolumen umfasste $2\text{ml}/\text{Well}$, was eine Endkonzentration der siRNA von 25nM entspricht. Am Vortag wurden je 2×10^4 Zellen der Nierenzellkarzinomzelllinie clearCa-6 bzw. 4×10^4 Zellen der Linie clearCa-12 in 6-Well Platten ausgesät. Der knockdown erfolgte über 72h, wobei nach 48h gegebenenfalls eine Topotecanbehandlung erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Konfluenz ca. 40 bis 50%. Die Kontrolle auf einen erfolgreichen knockdown erfolgte mittels Western Blot. Als Positivkontrolle wurde siRNA gegen Lamin mitgeführt, während eine scrambled siRNA als Negativkontrolle diente.

4.2.2 Caspase-Aktivitäts-Assays

Zur Bestimmung der Caspasen-Aktivierung nach Apoptoseinduktion mittels Zytostatikabehandlung wurden Caspase-staining Kits der Firma Promokine genutzt. Es wurden die Caspase-2, -3/-7, -8 und -9 im Durchflußzytometer untersucht. Das Prinzip nutzt für jede Caspase einen dafür spezifischen Caspase-Inhibitor der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, welcher permeabel für die Zellen ist und irreversibel an aktivierte Caspasen apoptotischer Zellen bindet. Da jeder Caspase-Inhibitor wahlweise mit einem roten bzw. grünen Farbstoff gekoppelt erhältlich ist, konnten auch Doppelfärbungen durchgeführt werden. Die Zellen wurden je nach Fragestellung zuvor in 6-Well Platten ausplattiert und behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1ml PBS gewaschen und mit 500µl Trypsin abgelöst, bevor die Zellen in gleichem Volumen Medium aufgenommen wurden. Die Suspension wurde zusammen mit dem zuvor gesammeltem Überstand in ein Falcon überführt, da dieser apoptotische Zellen enthält. Bei 300g und 21°C wurden die Zellen 5min zentrifugiert, das Pellet in 300µl frischem Medium aufgenommen, in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt und mit je 1µl des jeweiligen gefärbten Caspase-Inhibitors versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30min im Inkubator bei 37°C und 5%CO₂, wobei der Deckel des Reaktionsgefäßes geöffnet blieb. Im Anschluss wurden die Zellen nochmals bei 300g für 5min und 21°C zentrifugiert. Darauf wurden die Zellen in 500µl Waschpuffer resuspendiert und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, das Pellet in 500µl Waschpuffer aufgenommen, in Facs-Röhrchen pipettiert, auf Eis gehalten und sofort gemessen. Während der grüne Farbstoff in Kanal FL1 des Durchflußzytometers gemessen wurde, wurden rot gefärbte Zellen in Kanal FL2 gemessen.

4.2.3 Phospho-Histon H3 Messung

Um die Rolle der Caspase-2 in der Zellzykluskontrolle nach Apoptose-Induktion zu ermitteln, wurde in Caspase-2 knockdown Zellen das phosphorylierte Histon H3 nachgewiesen. Histone sind bei der Verpackung der DNA von Bedeutung und bilden mit dem Chromatin zusammen das sogenannte Nukleosom. Wird nun das Histon-H3 (Ser10) phosphoryliert, kommt es zur

Chromosomenkondensation und damit zum Eintritt der Zelle in die Mitose. Unphosphoryliertes Histon-H3 hingegen ist ein Zeichen dafür, dass die Zellen am G2/M-Checkpoint arretieren. Hier wurde die Abnahme des Phospho-Histon-H3 im Durchflußzytometer bestimmt. Dafür wurden die Zellen trypsinisiert und mitsamt dem Überstand bei 600g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1ml PBS aufgenommen und in ein mit 10ml eiskaltem, bei -20°C gelagertem 70% Ethanol, vorgelegtes Falconröhrchen überführt. Die Fixierung der Zellen erfolgte so bei -20°C über Nacht. Anschließend wurden die Zellen bei 600g und 4°C für 5min abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift in 1ml PBS und nochmaliger Zentrifugation wie zuvor. Danach wurde das Zellpellet in 100µl Antibody-Dilution Buffer aufgenommen und mit 4,2µg/ml Phospho-Histon H3 Antikörper versetzt und in ein dunkles Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt. Eine Isotypkontrolle wurde ebenfalls mitgeführt, um unspezifische Bindungen des Primäantikörpers auszuschließen. Die Inkubation erfolgte für 2h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Speed 750). Im Anschluss wurde die Zellsuspension wieder in Falcons pipettiert und mit 5ml Antibody-Dilution Buffer gewaschen. Bei 600g und 4°C wurden die Zellen 5min pelletiert, bevor sie mit 100µl Antibody-Dilution Buffer, versetzt mit 2µg des FITC-gekoppelten Sekundäantikörpers, gefärbt wurden. Auch hier erfolgte die Inkubation auf einem Schüttler (Speed 750) bei Raumtemperatur für 2h. Der Waschschrift mit 5ml Antibody-Dilution Buffer und die folgende Zentrifugation wurden wie zuvor beschrieben nochmals durchgeführt. Zuletzt wurden die so gefärbten Zellen mit Propidiumiodid versetzt (s. Kapitel 4.2.4).

Antibody-Dilution Buffer

1% BSA

0,1% Triton X-100

In PBS

4.2.4 Propidiumiodid-Färbung

Mittels des DNA-Farbstoffes Propidiumiodid wird der DNA-Gehalt in Zellen gemessen. Dazu werden die Zellmembranen durch vorheriges Fixieren durchlässig für den Farbstoff gemacht. Intakte Zellen besitzen sogenannte HMW- (high molecular weight) DNA im Zellkern, während apoptotische Zellen LMW- (low molecular weight) DNA besitzen, die durch Endonukleasen fragmentiert ist und sich auch im Zytoplasma verteilt. Je weniger DNA-Gehalt vorhanden ist, desto geringer fällt die Fluoreszenz aus, die hier im Durchflußzytometer gemessen wurde. So stellt der Sub-G1 Peak im Histogramm die apoptotischen Zellen dar, während Zellen mit steigender Fluoreszenz Zellen in der G0/G1-Phase, bzw. in der S-Phase und letztlich in der G2/M-Phase zu ermitteln sind. Daher wurden Zellen, die zuvor mittels Immunfluoreszenz für Phospho-Histon H3 (Ser10) gefärbt wurden (s. Kapitel 4.2.3), mit Propidiumiodid versetzt, um den Anteil der Zellen im Zellzyklusarrest zu ermitteln. Die pelletierten, Phospho-Histon H3 (Ser10) gefärbten Zellen wurden in 500µl Antibody-Dilution Buffer aufgenommen und mit 50µg/ml Propidiumiodid sowie 100µg/ml Rnase A versetzt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 1h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen in Facs-Röhrchen überführt, und bis zur Messung im Durchflußzytometer dunkel gehalten sowie auf Eis gestellt. Gemessen wurde in Kanal FL2 (PI-Färbung) bzw. in Kanal FL1 (Phospho-Histon H3 (Ser10) gefärbte Zellen).

PI-staining solution

500µg Propidiumiodid

1mg Rnase A

Ad 10ml Antibody-Dilution Buffer

4.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Extraktion von RNA erfolgte über Phenol-Chloroform-Fällung mittels TRI-Reagenz der Firma Sigma. Diese Methode beruht auf Phasentrennung durch Dichtezentrifugation. Phenol denaturiert dabei Proteine, während Chloroform neben seiner Wirkung als denaturierendes Reagenz ebenfalls die Phasengrenze stabilisiert. Die RNA-Fällung erfolgte mit Isopropanol. Die adhärennten Zellen wurden im Vorfeld durch Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in einem 15ml-

Falcon-Röhrchen bei 400g und 4°C 5min zentrifugiert und das anfallende Pellet in 1000µl TRI-Reagenz resuspendiert. Diese Lösung wurde in ein steriles Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt, mit 200µl Chloroform versetzt und mindestens 10sec gevortext. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 4°C, 15500g für 15min. Auf diese Weise erhielt man im Anschluss der Zentrifugation drei Phasen. Die obere, klare Phase stellt dabei die RNA-Fraktion dar, die mittlere Interphase enthält DNA und die untere, sog. organische Phase beinhaltet Proteine und Phenolreste. Die wässrige RNA-Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein frisches Eppendorfer Reaktionsgefäß mit vorgelegten 500µl eiskaltem Isopropanol gegeben und gevortext. Die RNA-Fällung vollzog sich dann entweder bei -20°C über Nacht oder für eine halbe Stunde bei -80°C. Daraufhin folgte eine weitere Zentrifugation bei 15500g und 4°C für 10min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500µl 70% Ethanol (zuvor bei -20°C gelagert) aufgenommen. Die Lösung wurde nun bei 6100g und 4°C für 5min zentrifugiert und das Pellet wieder in 500µl kaltem 70%igem Ethanol aufgenommen. Dieser Schritt wurde wiederholt, der Überstand restlos mit einer Pipettenspitze abgenommen und die RNA je nach Ausbeute in 25-50µl DEPC-H₂O resuspendiert und sofort auf Eis gelagert bzw. bei -80°C eingefroren. Die Quantifizierung erfolgte am Photometer, wobei das Lösungsmittel als Leerwert diente.

4.2.6 Photometrische Konzentrationsmessung von RNA und DNA

Die Quantifizierung isolierter RNA oder DNA erfolgte durch photometrische Messung an einem sogenannten Nanodrop-Gerät. Vorteil eines Nanodrop-Gerätes ist, dass eine kleine Menge der zu messenden Probe von 1µl ausreicht. Dabei wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen, da dort Nukleinsäuren ihr Absorptionsspektrum aufweisen. Daneben werden die Absorptionen bei den Wellenlängen 230nm sowie 280nm bestimmt. Bei 230nm werden Kohlenhydrate, Peptide sowie Phenolreste erfasst. Bei 280nm werden Proteine gemessen, da aromatische Aminosäuren (His, Phe, Trp, Tyr, Val) bei dieser Wellenlänge absorbieren. Durch Bildung der Quotienten 260/230 bzw. des Verhältnisses 260/280 kann so eine Aussage über die Reinheit der Probe gemacht werden. Der Quotient

260/280 sollte demnach bei DNA Proben mindestens 1,8 und bei RNA Proben bei 2,0 liegen, um große Verunreinigungen mit Proteinen auszuschließen. Das Verhältnis 260/230 gibt Auskunft über die Verunreinigung mit Peptiden und Kohlenhydraten und sollte etwa 2,3 betragen.

4.2.7 DNA-Restriktion

Zur Entfernung möglicher restlicher DNA-Bestandteile wurden die isolierten RNA Proben einer DNA-Restriktion unterzogen, bevor sie in komplementäre DNA umgeschrieben und in die Real-Time PCR eingesetzt wurden. Hierfür wurde das „Dnase I“- Kit der Firma Fermentas benutzt.

Pipettierschema

2µg RNA
2µl 10x Reaction buffer
2µl Dnase I [1u/µl]
ad 10µl mit DEPC-H₂O

Der Verdau erfolgte bei 37°C für 30min. Im Anschluss wurde in jede Probe 2µl 2mM EDTA hinzu pipettiert und die Reaktion bei 65°C für 10min gestoppt.

4.2.8 Reverse Transkription

Um die Expression der PIDD-Isoformen 1-4 untersuchen zu können, musste eine spezifische Reverse Transkription für PIDD-1 mit speziell dafür synthetisierten Primern durchgeführt werden, während für PIDD 2-4 mit Oligo(dt)₁₈ Primern gearbeitet werden konnte. Die Primer wurden selbst designed und von Biomers hergestellt. Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Kit „First strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas gebraucht. Um auch für PIDD-1 einen Abgleich der eingesetzten RNA Menge zu haben, wurde bei der Reversen Transkription sowohl der spezifische Primer „PIDD-2 reverse“ als auch der reverse Primer für das Housekeeping-Gen SDHA in die Probe gegeben, so dass man nur die cDNA der

exprimierten PIDD-1 bzw. SDHA RNA erhielt. Es wurde stets ein Mastermix hergestellt, um Pipettierfehler zu minimieren.

Pipettierschema PIDD-1/SDHA

1µg RNA (6µl aus DNA-Restriktion)
100pmol PIDD-2 rev
20pmol SDHA rev
ad 11µl mit DEPC- H₂O

Pipettierschema unspezifische RT

1µg RNA (6µl aus DNA-Restriktion)
1µl Oligo (dt)₁₈ Primer
ad 11µl mit DEPC- H₂O

Es erfolgt eine Inkubation für 5min bei 65°C, die Proben wurden an zentrifugiert und auf Eis gehalten

Ansätze vervollständigen

4µl 5x Reaction Buffer
1µl RiboLock Rnase Inhibitor
2µl 10mM dNTP Mix
2µl M-MuLV Reverse Transkriptase

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt, an zentrifugiert und bei 37°C 60min inkubiert, danach die Reaktion 5 min bei 70°C gestoppt und die Proben bei -20°C gelagert

4.2.9 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Sowohl in Nierengewebe verschiedener Tumorstadien als auch in den verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinien wurde die mRNA der PIDD Isoformen mittels quantitativer Real Time PCR quantifiziert. Die Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenfunktion (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986), die jedoch durch Fluoreszenzmessungen eine genauere Quantifizierung der Transkripte erlaubt. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert in die komplementäre DNA, wodurch das Fluoreszenzsignal von Zyklus zu Zyklus an Stärke gewinnt. Daher korreliert die Fluoreszenzstärke mit der Transkriptmenge in den Zellen. Da jedes Fragment eine spezifische Schmelztemperatur hat, ist es durch eine Schmelzpunktanalyse am Ende der qPCR Messung möglich, eine Aussage über die Spezifität des PCR Produktes zu erhalten: die Temperatur wird langsam in einem Intervall von 0,1°C pro Sekunde von 50°C auf 95°C erhöht. Bei der für das jeweilige PCR Produkt spezifischen Schmelztemperatur denaturiert das Fragment in zwei einzelsträngige Moleküle, wobei die Freisetzung des SYBR Green Farbstoffes gemessen wird. Genauer gesagt gibt die Schmelztemperatur T_m Auskunft darüber, bei welcher Temperatur

50% des Primers nicht mehr an die DNA-Matrize bindet. T_m ist dabei abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Basen, vor allem vom GC-Gehalt, da diese DNA-Abschnitte thermostabiler sind als AT-reiche Sequenzen.

Für Primer bis zu einer maximalen Länge von 20 Basen gilt dabei:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl Guanin} + \text{Cytosin}) + 2 \times (\text{Anzahl Adenin} + \text{Thymin})$$

Für Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basen gibt es eine von Baldino (Baldino, Jr. et al., 1989) entwickelte Gleichung:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10} [J+]) + 0,41 \times (\% G + C) - (675/n) \\ - 1 \times (\% \text{ Fehlpaarungen}) - 0,63 (\% \text{FA})$$

(J = Konzentration monovalenter Kationen in mol/l; % G+C = Anteil der Basen Guanin und Cytosin in Prozent; n = Anzahl der Basen im Oligonukleotid; % Fehlpaarungen = Anteil der fehlgepaarten Basen in Prozent; %FA = Anteil des Formamids im Puffer in Prozent, entfällt normalerweise bei der PCR).

Da die T_m keine Informationen darüber enthält, bei welcher Temperatur der Primer optimal hybridisiert, wird die Annealingtemperatur 5 bis 10°C niedriger als die T_m gewählt. Die Annealingtemperatur wurde hier in verschiedenen Testreihen optimiert, sowie die Zeit für das Annealing des Primers an die cDNA. Für PIDD-3 war es nötig, die Spezifität des Primers durch den Zusatz von 1% DMSO im PCR Ansatz zu erhöhen. Die qPCR der PIDD Isoformen 1-4 wurde mit Hilfe des Kit „Quanti Fast SYBR-Green PCR Mastermix“ der Firma Qiagen durchgeführt. Als Abgleich des eingesetzten Template wurde das Housekeepinggen SDHA amplifiziert. Die cDNA wurde im Vorfeld mit DEPC-H₂O in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Die Proben wurden in jedem Lauf als Doppelbestimmung geführt und es wurde stets ein Mastermix hergestellt. Die Läufe erfolgten am „Light Cycler“ der Firma Roche.

Pipettierschema

10µl SYBR-Green PCR Mastermix
xµl fwd Primer
xµl rev Primer
xµl DEPC- H ₂ O
<hr/>
16µl Mastermix + 4µl cDNA (1:5)

Für die Endkonzentrationen der eingesetzten Primer s. Tabelle 2. Dementsprechend wurden verschiedene Verdünnungen angesetzt. Für PIDD-3 wurde zusätzlich 1% DMSO in den Ansatz pipettiert. Es wurden für die PIDD-Isoformen jeweils 50 Zyklen für die Schritte III.-V. (Denaturierung, Annealing und Extension) gewählt, für SDHA nur 40 Zyklen.

qPCR-Programme

	PIDD-1	PIDD-2	PIDD-3	PIDD-4	SDHA	
I. Initiale Denaturierung	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min	
II. Denaturierung	95°C 10sec	95°C 10sec	95°C 10sec	95°C 10sec	95°C 10sec	
III. Annealing	60°C 30sec	62°C 30sec	67°C 25sec	60°C 30sec	60°C 30sec	} 40x (SDHA) 50x (PIDD)
IV. Extension	72°C 60sec	72°C 60sec	72°C 60sec	72°C 60sec	72°C 50sec	
V. Final Extension	72°C 8min	72°C 8min	72°C 8min	72°C 8min	72°C 8min	
VI. Schmelzpunktanalyse	55°C 15sec	55°C 15sec	55°C 15sec	55°C 15sec	55°C 15sec	
Schmelzpunktanalyse	95°C 0,1°C/sec	0,1°C/sec	0,1°C/sec	0,1°C/sec	0,1°C/sec	
VII. Kühlung	40°C ∞	40°C ∞	40°C ∞	40°C ∞	40°C ∞	

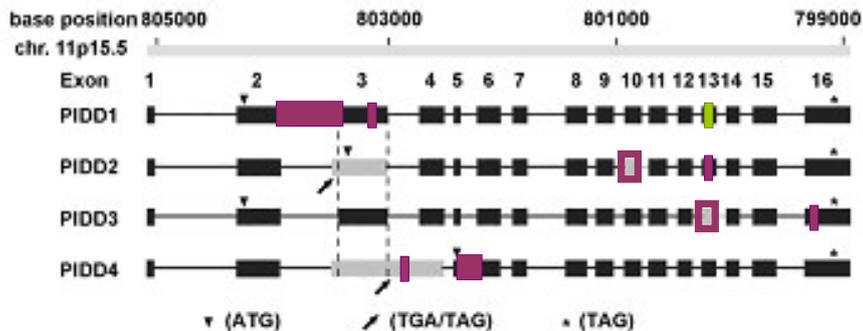


Abb.6: Schematische Darstellung der Primerlage für die Differenzierung der PIDD Isoformen

Die grau dargestellten Bereiche sind Exone, die eine Mutation aufweisen, die schwarzen Exone unterscheiden sich dagegen nicht in den Spleißvarianten. Grün und lila kennzeichnen die Primer, wobei der Grüne für die spezifische RT für PIDD-1 verwendet wurde, die Lilanen die Primer für die qPCR. Der Primer "PIDD-2 rev" für die spezifische RT von PIDD-1 liegt in Ex13, so dass PIDD-3 nicht umgeschrieben werden kann. Die Differenzierung von PIDD-2 und -4 ist dann durch PIDD-1 spezifische Primer möglich, die in den Bereichen liegen, die bei PIDD-2 und -4 alternativ gespleißt sind. Die übrigen RT Reaktionen konnten mit Oligo(dT₁₈)Primern erfolgen, da in der qPCR dann Primersequenzen für die jeweilige Isoform spezifisch gewählt werden konnten. Die Abbildung entstammt von Huang et al., 2011 wobei die Primer für die vorliegende Arbeit selbst designed wurden und der Abbildung hinzugefügt wurden.

4.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zu ihrer Größenbestimmung führt man gelelektrophoretisch durch. Dabei wandert die DNA, die aufgrund ihres Phosphatgerüsts negativ geladen ist, in einem Agarosegel in Richtung Anode. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch das Gel, während größere Fragmente langsamer laufen. Anhand eines Größenstandards, in dieser Arbeit eine 100bp DNA-Leiter, kann man die Fragmentgröße bestimmen. Die Konzentration an Agaroseanteil im Gel wird abhängig von der aufzutrennenden Fragmentlänge gewählt, dabei gilt: je kleiner die Produkte, desto höher die Agarosekonzentration, um die Siebstruktur des Gels zu variieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarosegele verwendet, die mit TBE-Puffer angesetzt wurden. Die Agaroselösung wurde mit 0,0025% (v/v) Ethidiumbromid versetzt, ein Farbstoff, der in DNA interkaliert und unter UV-Licht angeregt werden kann. Dabei emittiert er Licht im roten Bereich bei 599nm. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6 x DNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt, der

durch enthaltenes Glycerol die DNA beschwert und ein Herausdiffundieren der Proben aus den Geltaschen verhindert.

TBE-Puffer

10,8g Tris
5,5g Borsäure
1,5g EDTA (ad 1L dH₂O)

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus eukaryotischen Zellen

Je nach Versuchshintergrund wurden die Zellen in unterschiedlichen Formaten am Vortag ausgesät (60cm² Schalen bzw. 6-Well-Platten). Falls die Zellen zuvor behandelt wurden, erfolgte dies bei einer Konfluenz von ca. 40%. Um Proteine zu isolieren, wurde das Medium von den Zellen entfernt, und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden je nach Format 80-200µl Lysispuffer H auf die Zellen gegeben, und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Suspension wurde in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt und 20min auf Eis gelagert, wobei zwischenzeitlich mehrfach gevortext wurde. Die anschließende 20-minütige Zentrifugation erfolgte bei 20000g und 4°C. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde in ein frisches Eppendorfer Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80°C eingefroren.

Lysispuffer „H“

30mM Tris pH 7,5
150mM NaCl
1% Triton X-100
10% Glycerin
Protease Inhibitor (Roche)
bzw. Phosphatase Inhibitor (Roche)

4.3.2 Herstellung von fraktionierten Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Um die Proteine in eine Kern- bzw. Zytoplasmafraktion zu separieren, wurden die adhärennten Zellen zunächst mit Trypsin gelöst und in ein Falcon überführt. Für Apoptose-relevante

Untersuchungen wie z.B. nach Zytostatika Behandlung, wurde der Überstand, sprich Zellmedium, mitgeführt, da dieser gelöste Zellen enthält, die sich möglicherweise in der Apoptose befinden. Die Zentrifugation erfolgte bei 300g und Raumtemperatur für 5min. Das Pellet wurde mit 1ml PBS gewaschen und die Zellen nochmals bei 300g und 4°C für 5min zentrifugiert. Nun wurden die Zellen in 400µl HB-Puffer aufgenommen. Die darauffolgende Zentrifugation erfolgte wie zuvor. Danach wurde das Zellpellet je nach Größe in 150-200µl Lysispuffer aufgenommen und in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt. Die Inkubation erfolgte 15min auf Eis, wobei zwischendurch mehrere Male gevortext wurde. Folgend wurde die Suspension bei 18000g und 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand bildet die cytoplasmatische Fraktion und wurde in ein frisches Eppendorfer Reaktionsgefäß pipettiert. Das Pellet wurde nun mit 200µl Lysispuffer gewaschen, 5min auf Eis inkubiert und bei 18000g, 4°C für 5min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, bevor das Pellet je nach Größe in 50-80µl Puffer C resuspendiert wurde. Die Proben inkubierten 15min auf Eis, wobei jede Minute gevortext wurde. Daraufhin folgte die letzte Zentrifugation wie zuvor. Der Überstand enthält nun die Kernproteine und wurde in ein frisches Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt.

HB-Puffer

10mM Tris HCl pH 7,3
10mM KCl
1,5mM MgCl₂
0,5mM β-Mercaptoethanol
Protease-Inhibitor (Roche)

Lysispuffer

0,4% NP-40 (v/v)
in HB-Puffer

Puffer C

20mM HEPES pH 7,9
400mM NaCl
1mM EDTA
1mM DTT
Protease-Inhibitor (Roche)

4.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung im Kern- bzw. Zytoplasmalysat erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Bei diesem Assay geht der Farbstoff „Coomassie Brilliant Blau G-250“ in seiner anionischen Form mit Proteinen eine Bindung ein, die auf Van-der-Waals Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Dabei bindet der Farbstoff hauptsächlich an Seitenketten von Arginin, aber auch an Resten der Aminosäuren Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin (Compton and Jones, 1985). Durch die Bindung kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 365 zu 595nm. Zur photometrischen Bestimmung der Proteine wurde je 1µl der Proben in 1ml Bradford-Reagenz bei 595nm gemessen. Anhand einer Eichgerade mit bekannten Konzentrationen BSA-Lösungen wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Als Kontrolle diente ein Ansatz der Bradford-Lösung ohne Protein.

4.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht auf. Polyacrylamidgel ist ein Polymer aus Acrylamidmonomeren, die durch ein quervernetzendes Reagenz dreidimensionale Netzwerke ausbilden können. Diese Polymerisation wird von dem Radikal Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und von Tetramethylethyldiamin katalysiert (TEMED). Durch den Acrylamidgehalt des Gels ist die Porenweite des Netzwerkes variierbar und wird je nach Größe des aufzutrennenden Proteins gewählt. Nach Anlegen einer Spannung wandern kleinere Proteine schneller durch das Gel, während größere etwas zurückgehalten werden. SDS überdeckt dabei die Eigenladung der Proteine, so dass der negativ geladene SDS-Protein-Komplex zur Anode wandert. Bei einer diskontinuierlichen SDS-PAGE wandern die Proteine zunächst durch ein Sammelgel, welches schnell wandernde Leitonen (Chlorid) und langsam wandernde Folgeionen (Glycinat) enthält. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Sammelgel liegt Glycinat im Gleichgewicht mit dem ungeladenen Glycin und weist daher eine geringere

Mobilität auf. Durch diesen Mangel an Ladungsträgern herrscht in der Folgeschicht eine hohe Feldstärke, wodurch die SDS-Protein-Komplexe beschleunigt werden. Anders verhält es sich hingegen in der Schicht der Leitonen: hier liegt eine hohe Ionenstärke vor, so dass die SDS-Protein-Komplexe abgebremst werden, was sich in einer Aufkonzentrierung bzw. scharfen Banden äußert. Im folgenden Trenngel geht dieser Sammeleffekt verloren, u.a. durch einen höheren pH-Wert von 8,8. Hier liegt das Glycin dissoziiert als Glycinat vor. Die Folgeionen können nun die aufkonzentrierten SDS-Protein-Komplexe überholen. Da das Trenngel feinporiger ist und wie ein Sieb wirkt (durch höhere Acrylamidkonzentration), kann die Auftrennung der Proteine nun nach Molekulargewicht erfolgen. Vor dem Auftragen wurden die Proteinlysate mit 6 x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5min erhitzt. Das im Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol bewirkt durch eine Reduktion der Disulfidbrückenbindungen innerhalb der Peptidketten eine Denaturierung der Proteinquartärstruktur. Die Eigenladung der Proteine wird dann durch Anlagern von SDS an die Proteine überdeckt, so dass Wechselwirkungen unter den Polypeptidketten nicht mehr stattfinden können. Durch Erhitzen der Proben werden schließlich die Tertiär- und Sekundärstrukturen denaturiert. Solch vorbereitete Proteinproben wurden entweder sofort auf ein SDS-Gel aufgetragen oder vorübergehend bei -20°C gelagert. Die Zusammensetzungen der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

10 x Elektrophoresepuffer

10g SDS
30g Tris
144g Glycin
ad 1L dH₂O
(1x Gebrauchslösung)

Tab.5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

Sammelgel		Trenngel				
			5%	8%	10%	12%
H₂O	1,4 ml	H₂O	5,7 ml	4,7 ml	4,0 ml	3,3 ml
30% Acrylamid-Mix	0,33 ml	30% Acrylamid-Mix	1,6 ml	2,6 ml	3,3 ml	4,0 ml
1,0M Tris pH 6,8	0,25 ml	1,5M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS-Lösung	0,02 ml	10% SDS-Lösung	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS-Lösung	0,02 ml	10% APS-Lösung	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml

(Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Gel)

4.3.5 Proteintransfer (Western Blot)

Durch Western Blot können elektrophoretisch aufgetrennte Proteine dauerhaft von Gel auf eine Membran übertragen werden, was wiederum den Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper ermöglicht. Die Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit im Wet-Blot Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (0,45µm Porendurchmesser). Der Proteintransfer erfolgte in Mini-Trans-Blot Modulen der Firma Biorad. Der Blot wurde zwischen zwei Kunststoffgitter einer Gekassette aufgebaut. Dabei wurde ein Schwämmchen direkt auf das Kunststoffgitter gelegt, gefolgt von zwei Lagen Whatman-Papier und dem Gel. Nachdem die Membran auf das Gel platziert wurde, kamen nochmals zwei Lagen Whatman-Papier auf die Membran sowie abschließend wieder ein Schwämmchen. Alle Komponenten wurden zuvor in Transferpuffer eingelegt. Durch Abrollen mit einer Glaspipette auf dem obersten Whatman-Papier wurden eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Gel und Membran herausgedrückt, die einen kompletten Transfer der Proteine stören könnten. Die Gekassette wurde so geschlossen in die Blotkammer eingebaut, dass die Membran zur Anode, bzw. das Gel zur Kathode zeigt. Der Tank wurde komplett mit Transferpuffer befüllt und der Blot erfolgte entweder bei 90 Volt für 1,5 Stunden oder bei 30 Volt über Nacht und wurde durch Kühlakkus bzw. Eis kalt gehalten. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers der Proteine wurde die Membran nach dem Blotting mit Ponceau S Solution angefärbt. Dabei handelt es sich um einen roten Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindet. So konnte überprüft werden, ob die Proteine in gleichen Mengen auf

die Membran übertragen wurden. Vor der Immundetektion wurde die Membran mit dH_2O entfärbt und für mindestens 30min in Blockingpuffer (5% Milch in TBS-T) inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren.

TBS-T Waschpuffer

0,01M Tris
0,01M Tris pH 7,5
0,15M NaCl
0,01% Tween 20

Transferpuffer

25mM Tris
0,2M Glycin
20% (v/v Methanol)

Transferpuffer für DNA-PKcs

25mM Tris
0,2M Glycin
10% (v/v Methanol)

4.3.6 Immunoblot

Die Detektion der an die Membran gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe des LICOR-Odyssey Scanner. Dabei erfolgt der Nachweis über Infrarot-markierte Sekundärantikörper, die sich gegen die Spezies der Primärantikörper richten. Das Gerät verfügt über zwei separate Laser, die simultan zwei Infrarotfarbstoffe detektieren können. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (LI-COR IRDye 680 und LI-COR IRDye 780) werden durch die Laser bei einer Exzitationswellenlänge von 685 und 785nm angeregt und die Membran eingescannt und ausgewertet. Die Membran kann sowohl in zwei unterschiedlichen Kanälen für jeden Fluoreszenzfarbstoff als auch durch Overlay in einem Bild dargestellt werden. Durch separates Darstellen zwei verschiedener Farbstoffe in unterschiedlichen Kanälen ist es so möglich, auch Proteine mit geringem molekularem Größenunterschied auf einer Membran zu detektieren. Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in geeignetem Blockingpuffer verdünnt (s. Tabelle 3 & 4). Die Primärantikörper wurden stets in einem Falcon bei 4°C über Nacht auf einem Roller inkubiert, ausgenommen Tubulin und GAPDH, die für 2h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Sekundärantikörper wurden entweder bei RT für 1h inkubiert oder alternativ über Nacht bei 4°C . Sowohl nach Primär- als auch nach Sekundärantikörperinkubation wurde die Membran zweimal für 10min mit TBS-Puffer gewaschen.

5. Ergebnisse

Die Balance zwischen Apoptose und Zellüberleben sind bei der Tumorentstehung von enormer Bedeutung. Zahlreiche Proteine sind an diesen Signalwegen beteiligt. Zentrale Frage dieser Arbeit war es, inwieweit die Proteine PIDD und Caspase-2 bei der Regulation von pro- bzw. antiapoptotischen Signalwegen im humanen Nierenzellkarzinom beteiligt sind.

5.1 Apoptose- und Caspase-3 Aktivierung im Nierenzellkarzinom

Zunächst erforderlich war die Bestimmung einer Apoptose-auslösenden Konzentration bzw. Inkubationsdauer eines Zytostatikums, um eine mögliche Beteiligung der zu untersuchenden Proteine an diesen Signalwegen feststellen zu können. So wurde aus verschiedenen Zeit- und Konzentrationsreihen nach Topotecaninkubation die Apoptoserate in den Zelllinien clearCa-6, clearCa-9 und clearCa-12 ermittelt. In Western Blot Analysen der Abb.7 konnte die Apoptose anhand des nukleären Enzyms PARP und seinem Spaltprodukt nachgewiesen werden. Das in der DNA-Reparatur involvierte Enzym wird während Apoptoseprozessen von Caspase-3 gespalten und kann dann bei 89 kDa detektiert werden. So zeigte sich eine deutliche Apoptose in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 bereits bei einer Behandlung mit nur 1µg/ml Topotecan nach 24h, während die resistenten Zelllinien clearCa-9 und -12 erst deutliche PARP-Spaltprodukte bei einer zehnfachen Konzentration von 10µg/ml Topotecan nach 24h zeigten. Alle folgenden Versuche fanden unter Induktion der Apoptose statt. Die gewählte Konzentration für die jeweilige Zelllinie orientierte sich dabei an einer vergleichbaren Apoptoserate anhand des PARP-Spaltproduktes, so dass Rückschlüsse im Verhalten der zu untersuchenden Proteine vergleichend zu unbehandelten Zelllinien gezogen werden können.

Neben dem PARP-Spaltprodukt wurde zur weiteren Verifizierung der Apoptose auch die Aktivierung der Effektorcaspasen-3/-7 durchflußzytometrisch gemessen.

Wie der Abb.8 zu entnehmen ist, weist die Zelllinie clearCa-6 eine signifikante Caspase-3/-7 Aktivität von ca. 40% nach einer Topotecan Behandlung mit 1µg/ml nach 24h auf, während

clearCa-9 und -12 auch hier erst nach einer Konzentration von 10 μ g/ml und 24h eine relativ geringe Caspase-3/-7 Aktivität zeigen von ca. 15 bzw. ca. 10%. Trotz der geringen gemessenen Aktivität zeigte sich die Apoptose deutlich anhand des PARP-Spaltproduktes im Western Blot, was vermutlich an der zeitlichen Reihenfolge liegt, da Caspase-3/-7 früh aktiviert werden und erst im weiteren Verlauf PARP gespalten wird.

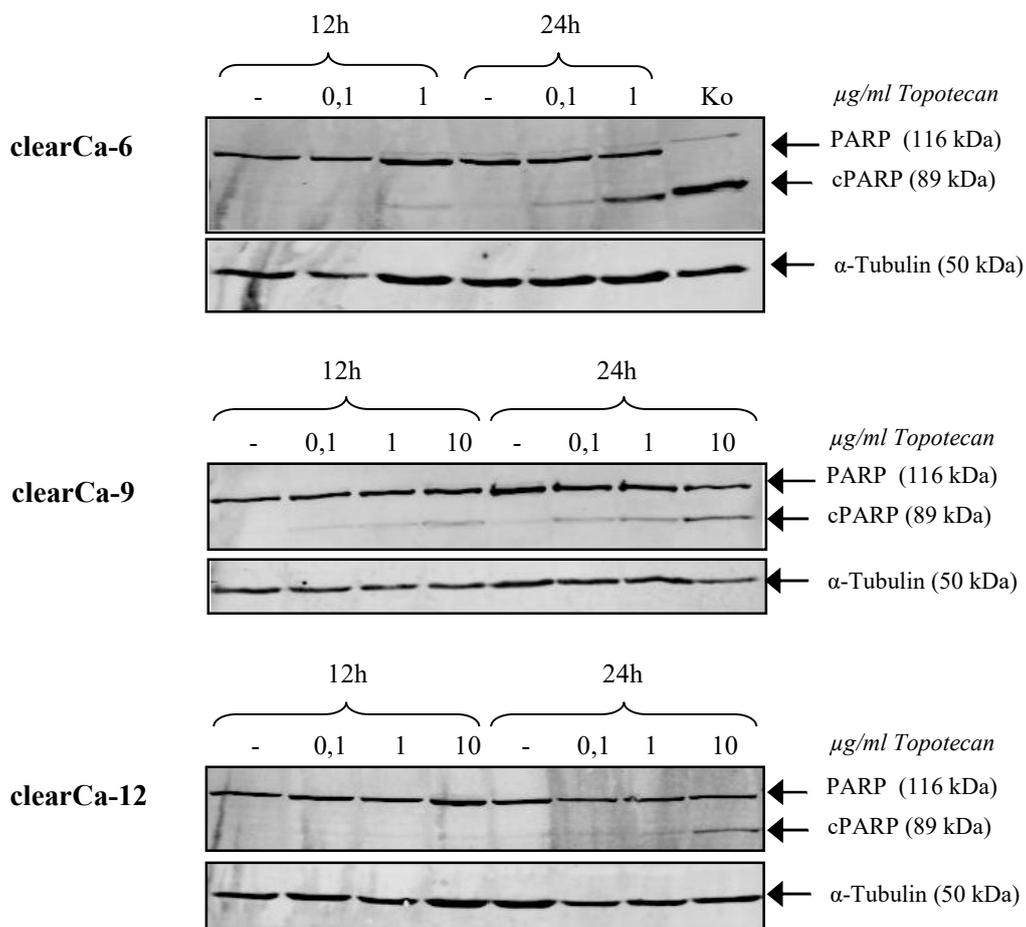


Abb.7: PARP-Spaltung nach Apoptose Induktion (Western Blot)

Die Behandlung der Nierenzellkarzinomzellen der Linien clearCa-6, -9 und -12 erfolgte mit definierten Konzentrationen Topotecan [0,1 μ g/ml; 1 μ g/ml; 10 μ g/ml] über 12 bzw. 24h. Für die resistenten Zelllinien clearCa-9 und -12 mussten höhere Konzentrationen verwendet werden, während die sensitive Zelllinie clearCa-6 mit Konzentrationen von nur 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml behandelt wurde und bereits Apoptose zeigte. Aufgetragen wurden je 60 μ g Gesamtlisat auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel. Zur Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinmenge wurde α -Tubulin nachgewiesen. Die Positivkontrolle (Ko) beinhaltet das Lysat von Jurkat Zellen, die mit 1 μ g/ml Topotecan für 12h inkubiert wurden, und hier exemplarisch dargestellt ist. Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n \geq 3.

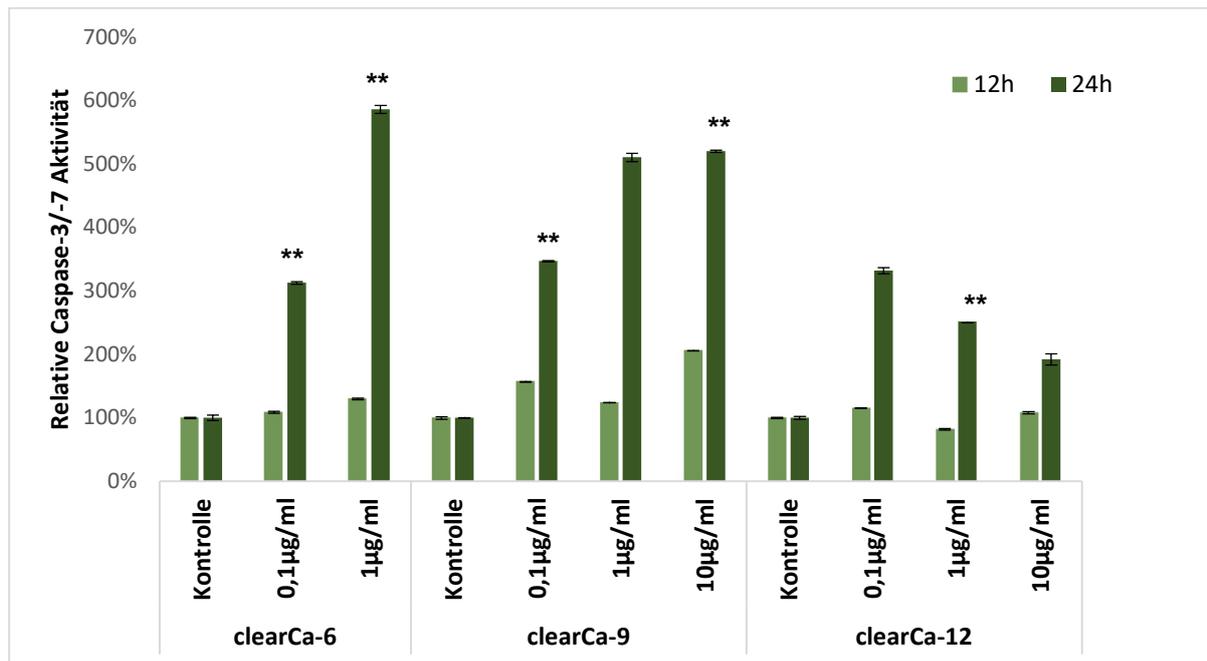


Abb.8: Caspase-3/-7 Aktivierung im Nierenzellkarzinom nach Apoptoseinduktion (FCM)
 Die Daten zeigen durchflußzytometrische Messungen zur Aktivierung der Caspase-3/-7 in den Nierenzellkarzinomzelllinien clearCa-6, -9, -12. Die Behandlung erfolgte mit Topotecan in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml für die sensitive Zelllinie clearCa-6, während für die resistenten Zelllinien clearCa-9 und -12 zusätzlich 10 µg/ml gewählt wurden. Die Wirkungsdauer betrug 12h und 24h. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

5. 2 Expression und Aktivierung der Caspase-2, -8, und -9 nach Apoptoseinduktion im Nierenzellkarzinom

Inwieweit die Caspase-2 im Nierenzellkarzinom exprimiert ist und ob ihr während der Apoptose eine Rolle als Initiator- oder Effektorcaspase zukommt, ist bislang unklar. Daher wurde hier ihre Expression sowie die Aktivierung nach Stressinduktion in den Zellen untersucht. Auch die Beteiligung der Initiatorcaspase-8 und -9 wurde überprüft. In vergangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe im Institut für Pathologie (UKD) konnte auf Transkriptionsebene eine Hochregulation von Gesamt-Caspase-2 mRNA während der Tumorprogression von Nierenzellkarzinomen demonstriert werden, während sich auf Proteinebene interessanterweise gleichzeitig eine Abnahme der Caspase-2 Proteinexpression zeigte. Die Caspase-2 ist jedoch einer der ersten der Caspasen, die in der Zytostatika-induzierten Apoptose in Nierenzellkarzinomen aktiviert wird (Heikaus et al. 2010). Nach Gabe

von Topotecan zeigten sich in den sensitiven Zellen der Linie clearCa-6 die höchsten Aktivierungen der Caspase-2, -8 und -9 auf (Abb.9). So war ca. 20% einer signifikanten Caspase-2 Aktivierung in clearCa-6, ca. 9% signifikante Aktivierung in clearCa-9 und 6% in clearCa-12 zu verzeichnen. Die Caspase-8 war mit 12% in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 signifikant aktiviert. clearCa-9 und -12 wiesen hingegen nur sehr geringe Beteiligung der Caspase-8 mit ca. 3% bzw. 1,6% auf. Ähnlich verhält es sich bei Caspase-9: so weisen auch hier Zellen der Linie clearCa-6 mit knapp 11% eine signifikante Aktivierung auf, während clearCa-9 eine signifikant geringe Beteiligung mit nur 3,5% und clearCa-12 nur 2,3% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen aufwiesen.

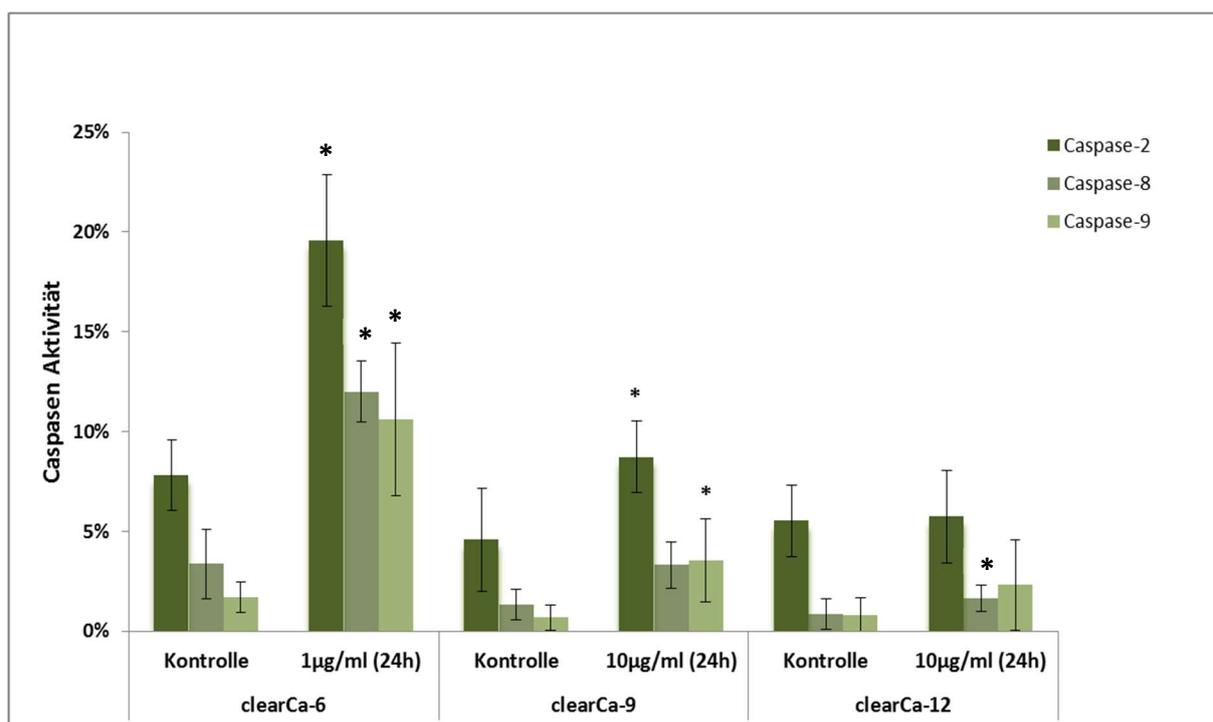


Abb.9: Caspase-2, -8 und -9 Aktivierung im Nierenzellkarzinom nach Apoptoseinduktion (FCM)

Die Daten zeigen durchflußzytometrische Messungen zur Aktivierung der Caspase-2, -8, und -9 in den Nierenzellkarzinomzelllinien clearCa-6, -9, -12. Die Behandlung erfolgte mit Topotecan in den Konzentrationen die in der jeweiligen Zelllinie Apoptose auslösen [1µg/ml bzw. 10µg/ml]. Die Behandlungsdauer betrug 24h, bevor die Proben gefärbt und im FCM gemessen wurden. Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

In Western Blot Analysen wurden analog zu den durchflußzytometrischen Daten, die direkten Aufschluss über die Aktivierung geben, die Proteinexpressionen der Procaspasen vor und nach Behandlung mit Topotecan dargestellt (Abb.10).

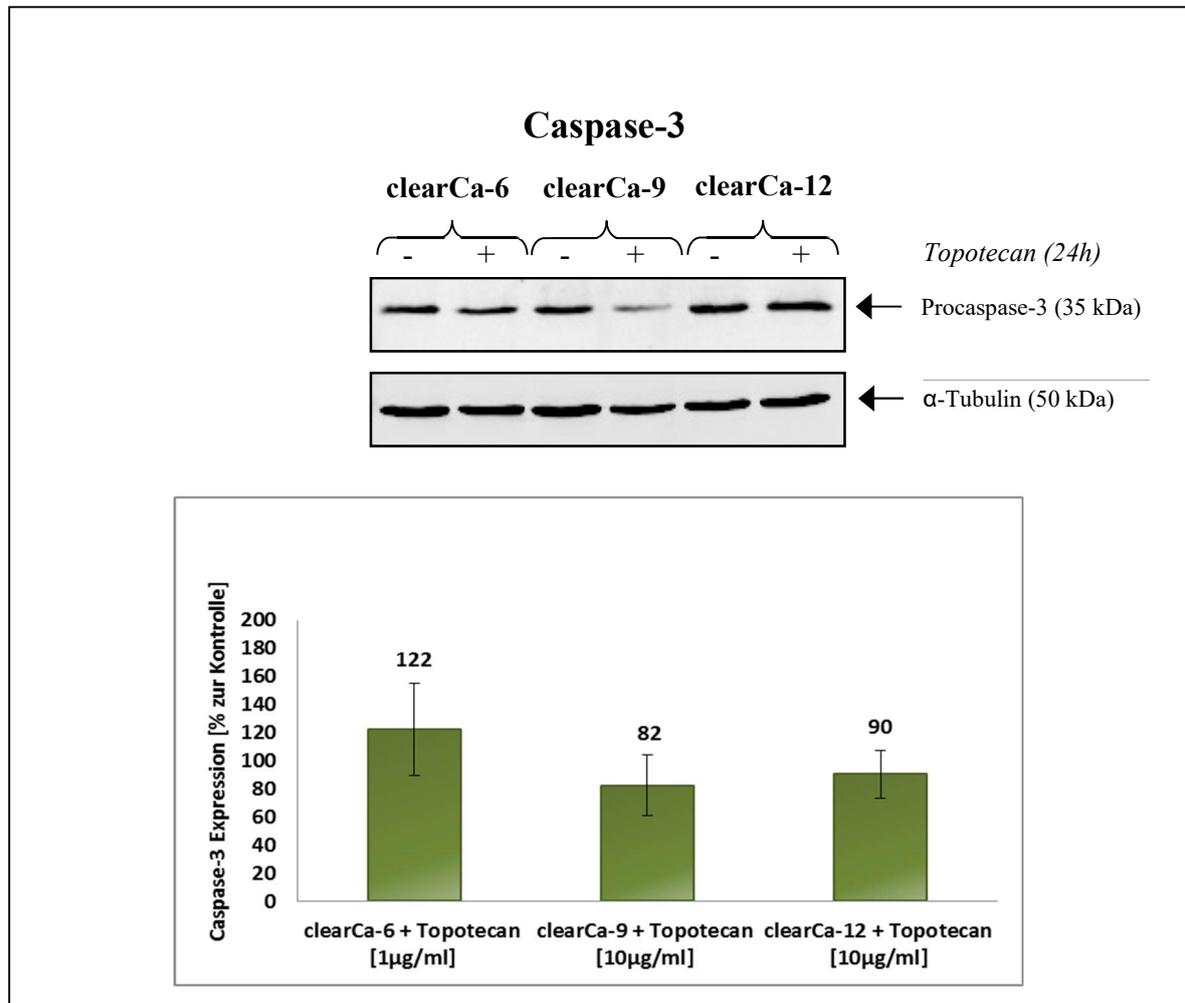


Abb.10: Caspase-3 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB)
Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des oben abgebildeten Western Blots zur Detektion der Procaspase-3, wobei zum Abgleich α -Tubulin nachgewiesen wurde. Aufgetragen wurden 50 μ g Gesamtlisat auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h. Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n \geq 3.

Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass die Effektorcaspase-3 lediglich in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 mit einer Expression von 122% im Vergleich zur Kontrolle (100%) nach der Behandlung mit Topotecan eine Erhöhung aufweist, obwohl die durchflußzytometrischen

Daten eine Aktivierung der Caspase-3 in allen untersuchten Zelllinien zeigte, was auf apoptotische Prozesse hinweist. clearCa-9 Zellen zeigten sogar mit 82% eine um 18% geringere Expression der Procaspase-3 als in unbehandelten Zellen. Ähnlich verhielt es sich mit 90% Expression eine um 10% geringere Expression in der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-12 vergleichend zur unbehandelten Kontrolle.

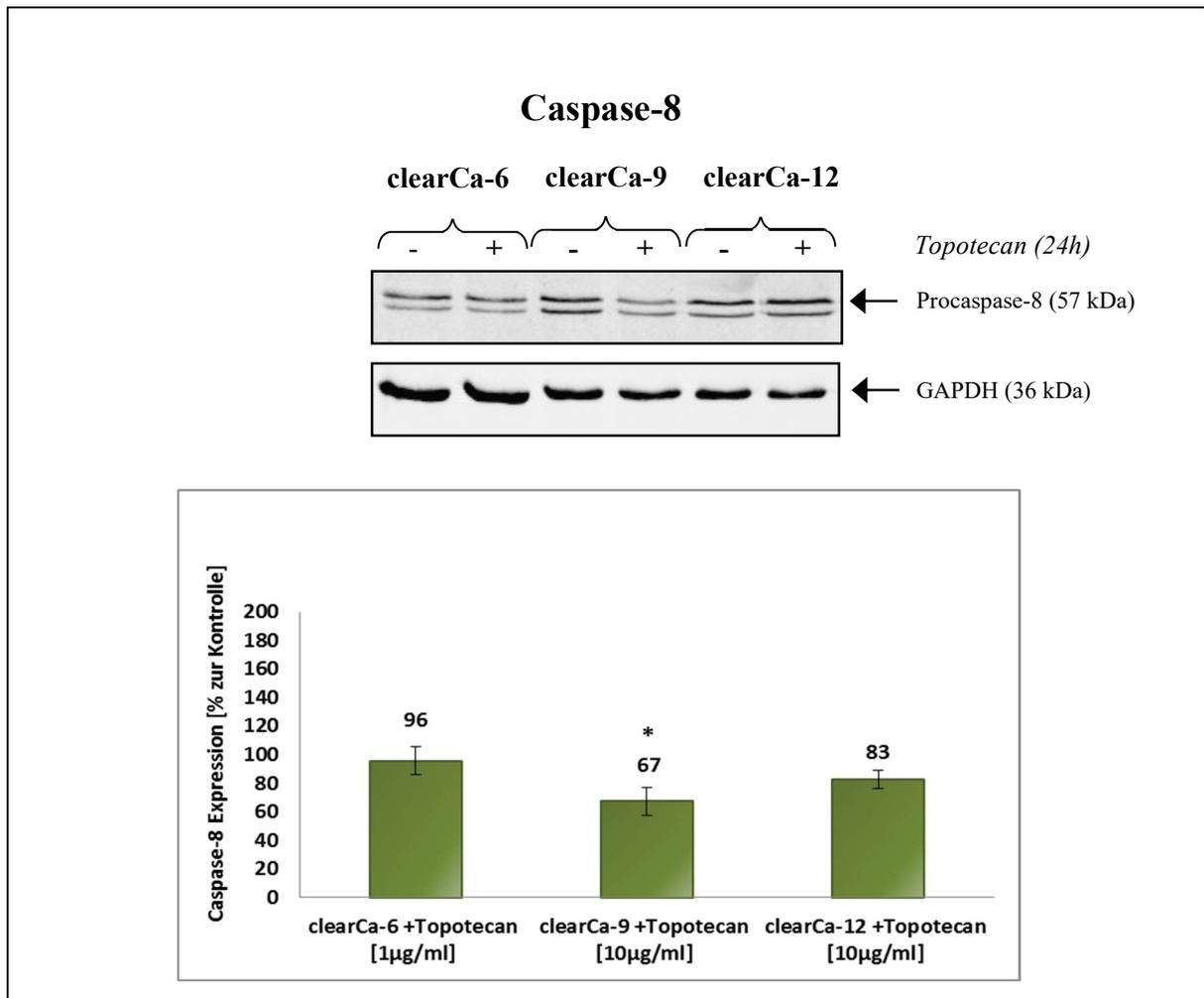


Abb.11: Caspase-8 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB)
 Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des oben abgebildeten Western Blots zur Detektion der Procaspase-8, wobei zum Abgleich GAPDH nachgewiesen wurde. Aufgetragen wurden 40µg Gesamtlisat auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

Die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 war bei allen Nierenkarzinomzelllinien im Durchflußzytometer sehr gering. Die sensitive Zelllinie kam mit 12% auf die höchste Beteiligung, während beide resistenten Linien unter 5% Aktivierung aufwiesen. Die Expression der Procaspase-8, wie in Abbildung 11 zu sehen ist, nimmt in allen Zelllinien ab: eine signifikant niedrigere Expression mit 67% im Vergleich zur Kontrolle nach Apoptoseinduktion ist in der Zelllinie clearCa-9 zu detektieren, während die Procaspase-8 Expression der p53 intakten Zelllinien clearCa-12 mit 83% und clearCa-6 mit 96% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen fast gleichbleibend ist.

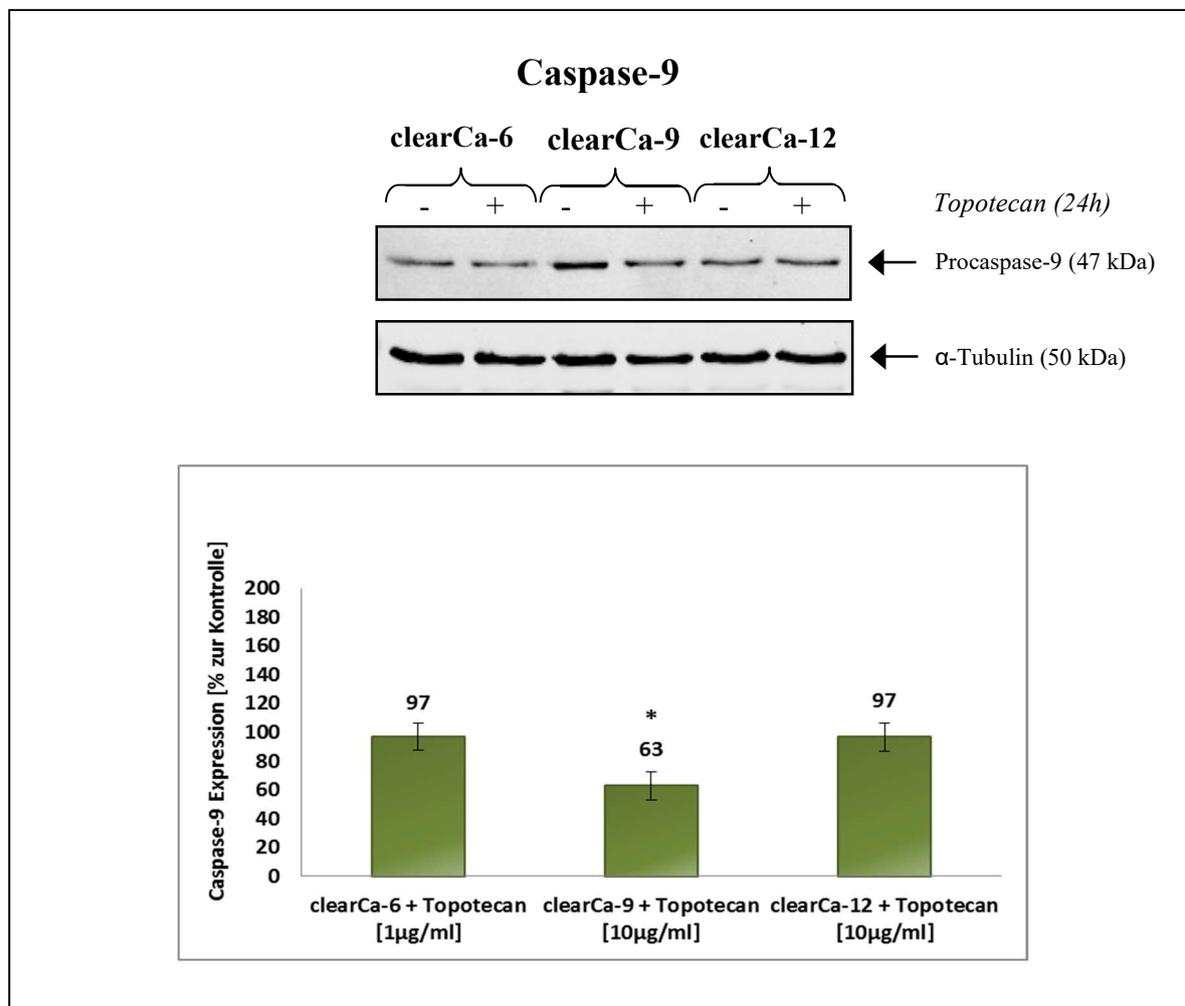


Abb.12: Caspase-9 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB)
Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des oben abgebildeten Western Blots zur Detektion der Caspase-9, wobei zum Abgleich Tubulin nachgewiesen wurde. Aufgetragen wurden 40µg Gesamtlisat auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

Ähnlich verhält es sich bei Expressionsanalysen der Initiatorcaspase-9: Auch hier konnte der stärkste Expressionsunterschied in den resistenten Zellen der Linie clearCa-9, die mutant für p53 ist, festgestellt werden. Die Menge der Procaspase-9 verringerte sich in seiner Expression mit 63% um signifikante 37% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auch hier änderte sich das Expressionsverhalten der Linien clearCa-6 und clearCa-12, die beide ein intaktes p53 System aufweisen, mit 97% im Vergleich zu unbehandelten Zellen kaum (s. Abb.12).

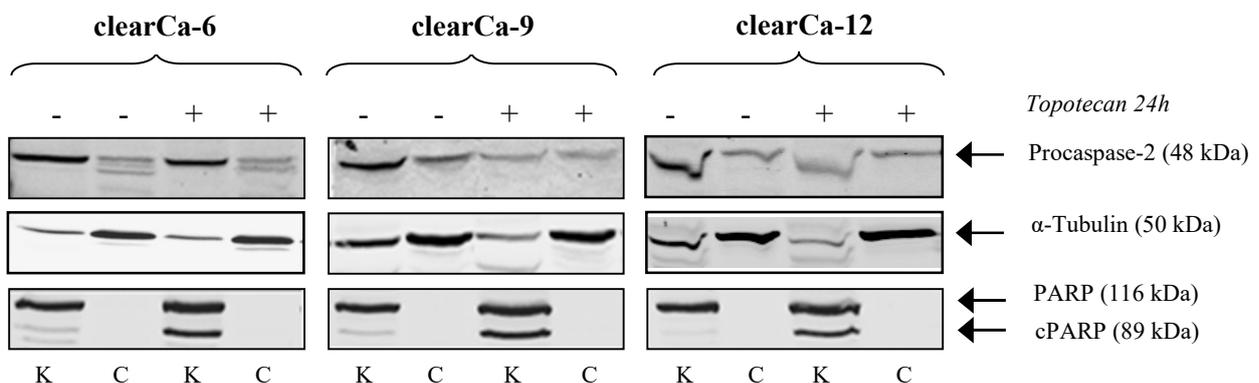
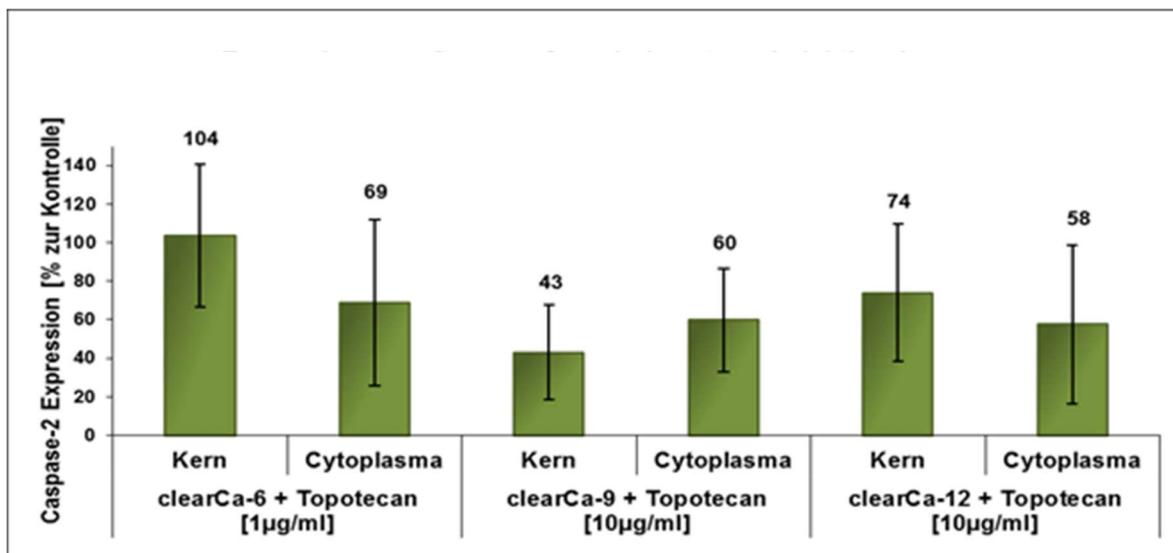


Abb.13: Fraktionierte Caspase-2 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB)

Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des unten abgebildeten Western Blots zur Detektion der Caspase-2. Zum Abgleich wurde Tubulin nachgewiesen. Aufgetragen wurden 100 µg fraktionierte Proteinlysate auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Reinheit der nukleären Fraktionierung, sowie die Apoptose wurde hier mittels Antikörper für das Kernprotein PARP und das apoptotische Spaltprodukt cleaved PARP (cPARP) überprüft, während Tubulin die Reinheit der cytoplasmatischen Fraktion zeigt sowie als Abgleich für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dient. Als Abgleich für die Kernfraktion wurde die Ponceau Färbung densitometrisch gemessen und in der Auswertung berücksichtigt. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h ["K": Kernfraktion; "C": Cytoplasmatische Fraktion]. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

Die Beteiligung der Caspase-2 im Nierenzellkarzinom konnte bislang nicht geklärt werden und wirft viele Fragen auf. Sie ist eine der ersten Caspasen, die im Nierenzellkarzinom aktiviert wird, obwohl deren Hemmung eine eher untergeordnete Rolle bei der Apoptose zukommen lässt. Ausserdem konnte im Nierenzellkarzinom bislang gezeigt werden, dass die Aktivierung mit der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Topotecan induzierter Apoptose einhergeht (Heikaus et al., 2010). Die durchflußzytometrischen Daten dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass die Aktivierung der Caspase-2 möglicherweise zelllinienspezifisch ist: so war eine deutliche Aktivierung in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 zu detektieren, während clearCa-9 und -12 eine sehr geringe Aktivität der Caspase-2 aufwies (s. Abb.9). Da die Funktion der Caspase-2 auch in anderen Zelllinien kontrovers diskutiert wird, wurden hier fraktionierte Proteinlysate hergestellt, um eventuelle Änderungen der Lokalisation nach Apoptoseinduktion beobachten zu können. Denn je nach zellulärer Lokalisation fungiert die Caspase-2 zusammen mit RAIDD und PIDD als proapoptotischer Proteinkomplex im Zytoplasma oder aber innerhalb des DNA-PKcs-PIDDosoms am G2/M-Checkpoint sowie am NHEJ. In unbehandelten Zellen scheint demnach die Hauptlokalisierung der Caspase-2 im Zellkern zu sein (s. Abb.13). Induziert man nun Apoptose, so nimmt interessanterweise die Expression im Zytoplasma als auch in den Kernfraktionen insbesondere in den beiden resistenten Zelllinien clearCa-9 und -12 ab. So exprimierten nach Apoptoseinduktion die Zelllinien clearCa-9 und -12 im Zellkern nur noch 43% bzw. 74% und im Zytoplasma 60% bzw. 58% die Caspase-2. Die sensitive Linie clearCa-6 stellt demnach die einzige der untersuchten Zelllinien dar, die in der Kernfraktion mit einer Expression von 104% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle entspricht 100%) keine verringerte Expression der Caspase-2 aufweist (s. Abb.13). Zudem konnte hier mit ca. 20% die höchste Aktivität der Caspase-2 anhand der durchflußzytometrischen Messungen ermittelt werden (s. Abb.9). Im Zytoplasma ist mit 69% ein vergleichsweise geringerer Rückgang zu beobachten, der sich allerdings auf die full length Procaspase-2 bezieht, und keinen Rückschluss auf die Aktivierung zulässt.

5.3 Expression der PIDDosomen-Mitglieder im humanen Nierenzellkarzinom

Caspase-2 bildet zusammen mit PIDD mehrere Multiproteinkomplexe aus, die in der Zelle unterschiedliche Aufgaben übernehmen: Im Zytoplasma formen sie zusammen mit RAIDD das sog. RAIDD-PIDDosom, das an den apoptotischen Signalwegen beteiligt ist, während sie im Nukleus der Zelle zusammen mit DNA-PKcs im sog. DNA-PKcs-PIDDosom vorliegen, das am G2/M Arrest und am „Non-homologous end joining“, einen Mechanismus zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, partizipiert. Daneben gibt es noch einen dritten, nukleär lokalisierten Multiproteinkomplex, das NEMO-PIDDosom. Hier interagiert PIDD mit NEMO und RIP1 und kann den Zellüberlebensweg NFκB aktivieren. Da ein ausgewogenes und reguliertes Verhältnis zwischen Apoptose und Zellüberleben für die Tumorentstehung von enormer Bedeutung ist, wurden in dieser Arbeit die drei PIDDosomen Komplexe, die an eben solchen Signalwegen beteiligt sind, im humanen Nierenzellkarzinom auf ihre Expression und Lokalisation hin untersucht. Die Ergebnisse wurden im Weiteren mit denen analysiert, die nach Apoptoseinduktion detektiert werden konnten, um Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung der Komplexe an der Apoptose ziehen zu können, insbesondere auch zwischen sensitiven und resistenten Nierenzellkarzinomzelllinien.

Die Western Blot Analysen des multifunktionalen Proteins PIDD, welches das "Kernprotein" der drei Multiproteinkomplexe darstellt, zeigt, dass lediglich die Isoform PIDD-3 in den humanen Nierenzellkarzinomzelllinien vorhanden ist (s. Abb.14). Dabei ist es sowohl in der Kernfraktion als auch im Zytoplasma lokalisiert. PIDD-3 ist bislang als proapoptotische Hilfe unterstützend zu der Hauptform PIDD-1 beschrieben worden, ist allerdings nicht alleine dazu befähigt, Apoptose zu induzieren. Zudem kann PIDD-3, ausgelöst durch genotoxischem Stress, den NFκB Zellüberlebenssignalweg aktivieren (Cuenin et al. 2008). Die sensitive Zelllinie clearCa-6 unterscheidet sich im Ergebnis dieser Untersuchungen insofern, dass hier eine signifikante Abnahme von PIDD-3 im Zytoplasma auf 25% nach Apoptose Induktion zu beobachten ist. Hingegen dazu kommt es im Nukleus dieser Zelllinie zu einer Erhöhung auf 367% gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle entspricht 100%). Die beiden resistenten Linien clearCa-9 und -12 zeigen hingegen im Zytoplasma behandelter Zellen eine Zunahme auf 140% bzw. 143%. Die Kernfraktion der Linie clearCa-9 zeigte eine - zur sensitiven

Zelllinie vergleichsweise - geringe Zunahme auf 174% während clearCa-12 mit einer Expression von 93% im Vergleich zur Kontrolle etwas weniger PIDD-3 aufwies.

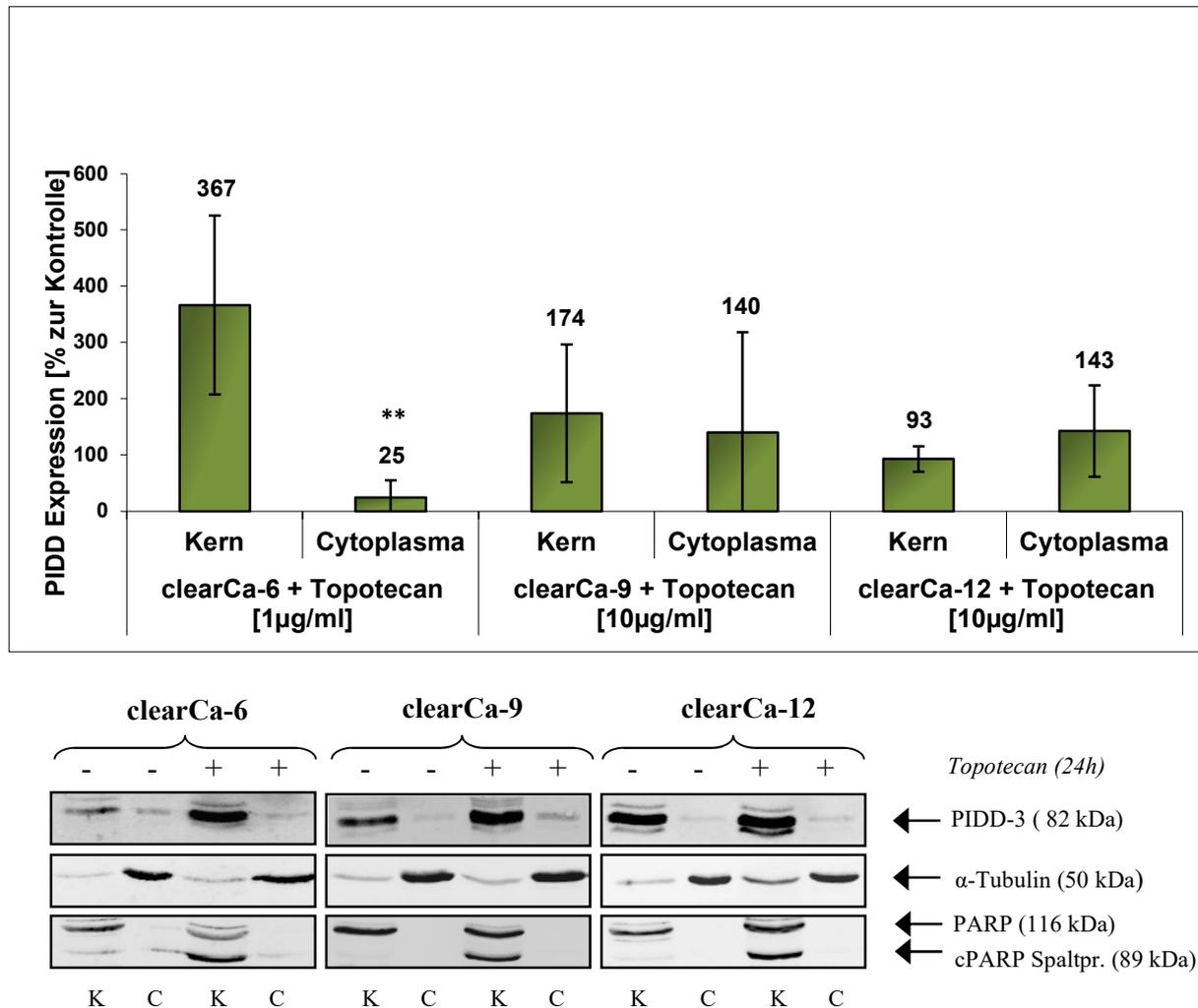


Abb.14: Lokalisation von PIDD in Nierenzellkarzinomzelllinien nach Applikation von Zytostatika (WB)

Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des unten abgebildeten Western Blots zur Detektion von PIDD. Aufgetragen wurden 50µg fraktionierte Proteinlysate auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Reinheit der nukleären Fraktionierung, sowie die Apoptose wurde hier mittels Antikörper für das Kernprotein PARP und das apoptotische Spaltprodukt cleaved PARP (cPARP) überprüft, während α-Tubulin die Reinheit der cytoplasmatischen Fraktion zeigt sowie als Abgleich für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dient. Als Abgleich für die Kernfraktion wurde die Ponceau Färbung densitometrisch gemessen und in der Auswertung berücksichtigt, da ein Abgleich durch aufgrund der Spaltung nach Behandlung problematisch ist. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h ["K": Kernfraktion; "C": Cytoplasmatische Fraktion]. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

Das Protein RAIDD, das an dem zytoplasmatischen proapoptotischen Komplex mit PIDD und Caspase-2 beteiligt ist (Tinel and Tschopp, 2004), zeigte in allen untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien seine Hauptlokalisierung im Zytoplasma (s. Abb.15). Durch Behandlung mit Topotecan war ein Rückgang der Expression von RAIDD im Zytoplasma in den beiden resistenten Linien clearCa-9 und -12 auf 77% bzw. 75% zu verzeichnen. Hingegen kam es zu einer verstärkten Expression in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 auf 379%, wo auch eine besonders starke Akkumulation von RAIDD im Nukleus detektiert werden konnte (808% im Vergleich zu der Kontrolle). Auch in der Zelllinie clearCa-12 kam es zu einer verstärkten Expression im Zellkern mit jedoch nur 192% zur Kontrolle, während clearCa-9 Zellen wie auch im Zytoplasma auch im Kern eine verringerte Expressionsrate mit 61% aufwiesen. Ebenso zeigten die sensitiven clearCa-6 Zellen nicht nur die höchste Aktivierung der Caspase-2, die an der RAIDD-PIDDosom vermittelten Apoptose beteiligt ist, sondern auch weiterhin eine konstante Expression der Caspase-2 im Zellkern. Die beiden resistenten Linien hingegen zeigten hier eine Verringerung der Expression, die auch mit einer geringeren Aktivierung einhergingen (s. Abb.15 und Abb.9).

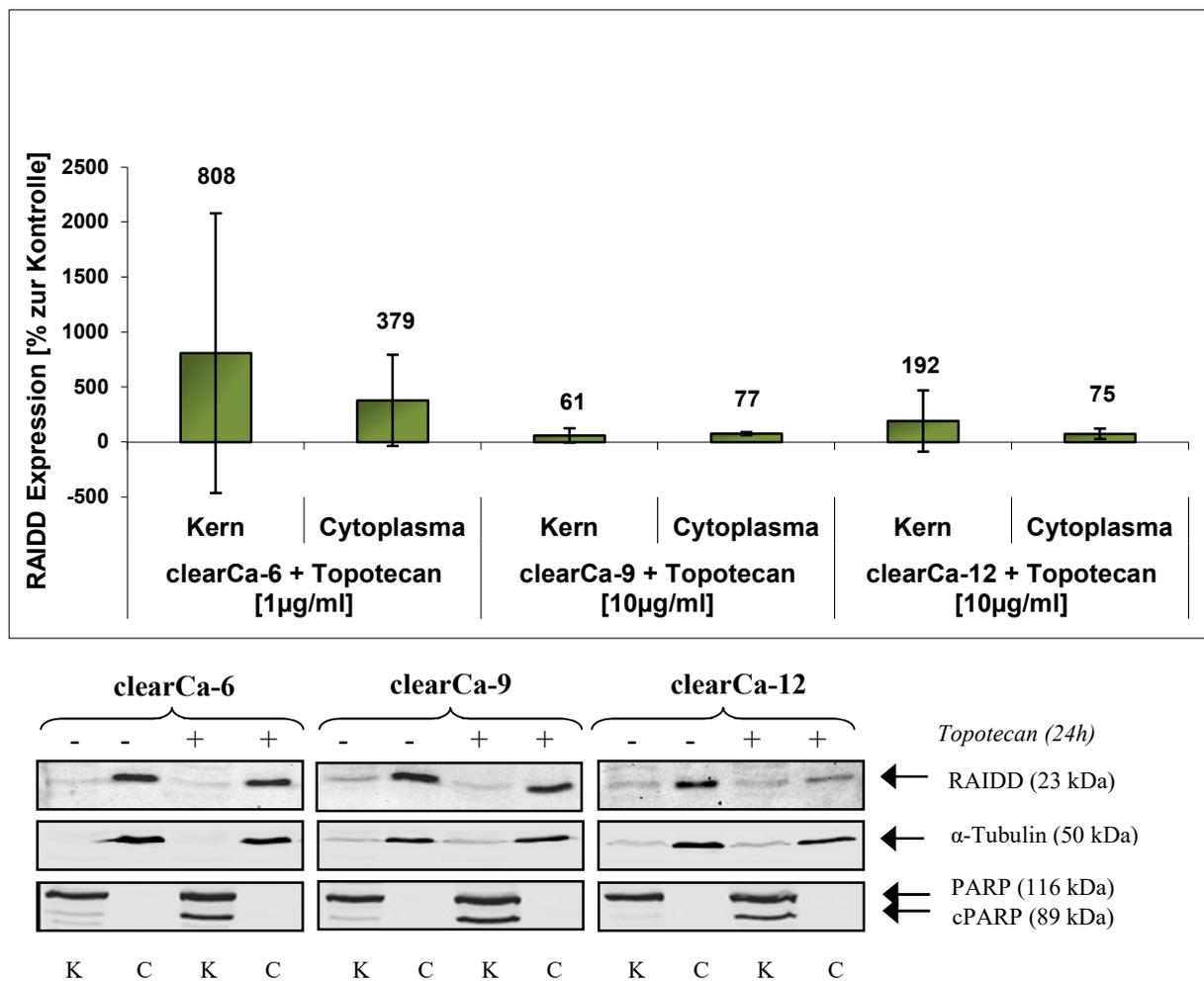


Abb.15: Expression von RAIDD in Nierenzellkarzinomzelllinien nach Applikation von Zytostatika (WB)
 Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des unten abgebildeten Western Blots zur Detektion von RAIDD. Zum Abgleich wurde Tubulin nachgewiesen. Aufgetragen wurden 40µg fraktionierte Proteinlysate auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Reinheit der nukleären Fraktionierung, sowie die Apoptose wurde hier mittels Antikörper für das Kernprotein PARP und das apoptotische Spaltprodukt cleaved PARP (cPARP) überprüft, während α -Tubulin die Reinheit der cytoplasmatischen Fraktion zeigt sowie als Abgleich für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dient. Als Abgleich für die Kernfraktion wurde die Ponceau Färbung densitometrisch gemessen und in der Auswertung berücksichtigt. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h ["K": Kernfraktion; "C": Cytoplasmatische Fraktion]. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

NEMO, neben RIP1 und PIDD am NEMO-PIDDosom beteiligt, kann im Gegensatz zum RAIDD-PIDDosom den Zellüberlebenssignalweg aktivieren. Es ist im Nukleus der Zelle lokalisiert und sowohl RIP1 als auch NEMO sind Teil dieser durch DNA-Schaden induzierten NFκB-Aktivierung (Hur et al. 2003; Huang et al. 2000; Huang et al. 2003). Dabei kommt es nach Bildung des NEMO-PIDDosoms zu einer durch PIDD ermöglichten Sumoylierung von NEMO, was für den Export von NEMO in das Zytoplasma unerlässlich ist, wo es NFκB aktivieren kann (Janssens et al. 2005; Huang et al. 2003). Die Expressionsanalysen aus Abbildung 16 zeigen, dass NEMO vor allem im Zytoplasma aller untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien in ähnlichem Verhältnis abnimmt. So ist nach Behandlung mit Zytostatika in Apoptose auslösender Konzentration in clearCa-6 Zellen nur noch eine Expression von 64% im Vergleich zur Kontrolle, in clearCa-9 68% und clearCa-12 ein signifikanter Rückgang auf 62% zu beobachten. Hingegen nimmt die Expression im Kern in den Zelllinien clearCa-6 und -12 mit 108% bzw. 169% besonders in der resistenten Linie clearCa-12 zu. clearCa-9 Zellen exprimieren im Kern mit 85% jedoch weniger NEMO, als die unbehandelten Kontrollzellen. So könnte die Zunahme der Expression im Zellkern in clearCa-6 als sensitive Zelllinie wie auch in der resistenten Linie clearCa-12 ein Hinweis auf eine NFκB-Aktivierung sein, die in Kapitel 5.4 vorgestellt wird.

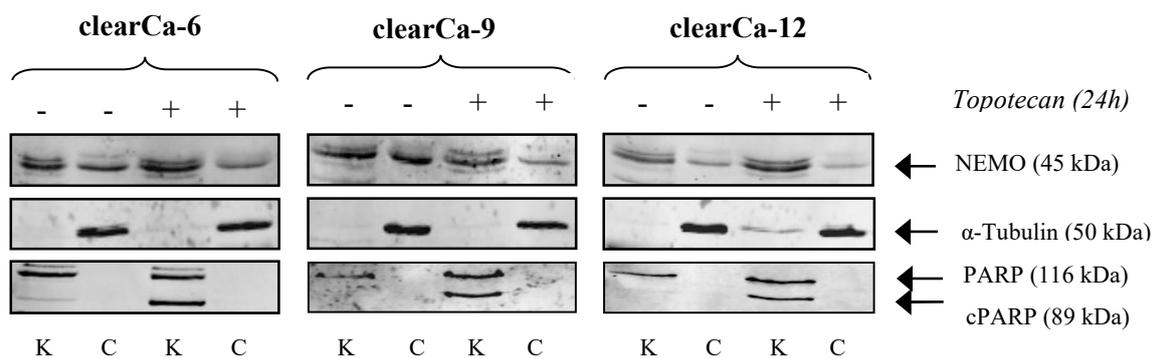
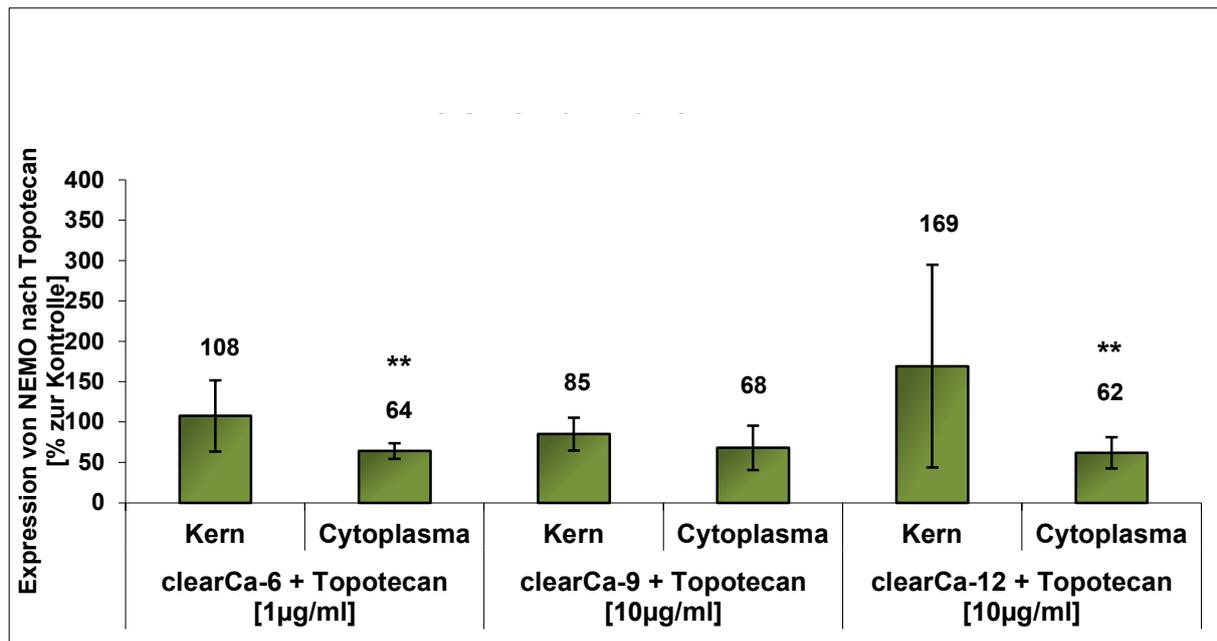


Abb.16: Fraktionierte Expression von NEMO im Nierenzellkarzinom nach Applikation von Zytostatika (WB)

Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des unten abgebildeten Western Blots zur Detektion von NEMO. Aufgetragen wurden 50µg fraktionierte Proteinlysate auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Reinheit der nukleären Fraktionierung, sowie die Apoptose wurde hier mittels Antikörper für das Kernprotein PARP und das apoptotische Spaltprodukt cleaved PARP (cPARP) überprüft, während α -Tubulin die Reinheit der cytoplasmatischen Fraktion zeigt sowie als Abgleich für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dient. Als Abgleich für die Kernfraktion wurde die Ponceau Färbung densitometrisch gemessen und in der Auswertung berücksichtigt. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h ["K": Kernfraktion; "C": Cytoplasmatische Fraktion]. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. $n \geq 3$.

RIP1, der dritte Bestandteil des NEMO-PIDDosoms, zeigte sich wie auch NEMO in den Nierenzellkarzinomzellen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert (Abb.17). Nach Auslösen der Apoptose durch Behandlung mit Topotecan kam es einzig in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 zu einer erhöhten Expression im Nukleus mit 179%. clearCa-9 und -12 wiesen eine geringere Expression von 95% bzw. signifikanten 78% auf. Jedoch könnte die verringerte Lokalisierung im Zellkern der clearCa-12 Zellen auf eine Verlagerung in das Zytoplasma hinweisen, denn hier war mit 121% eine Erhöhung zu detektieren. Andersherum verhält es sich bei clearCa-6 Zellen, wo im Gegensatz zur Erhöhung im Kern um 79% weniger RIP1 im Zytoplasma lokalisiert ist. Hier war mit einer Expression von 56% im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Rückgang um 44% zu verzeichnen (Abb.17). Möglicherweise ist die Erhöhung von RIP1 in den sensitiven clearCa-6 Zellen im Nukleus ein Hinweis auf eine verstärkte Bildung des NEMO-PIDDosoms, da auch NEMO unter apoptotischen Bedingungen leicht erhöht im Zellkern vorzufinden ist. Denn meist kommt es zur simultanen Aktivierung sowohl von Apoptose als auch NFκB, und letztendlich entscheidet über das Zellschicksal das Ausmaß der Schädigung, so dass einer der beiden Signalwege überwiegt. Die resistenten clearCa-12 Zellen hingegen zeigten einen sehr hohen Anstieg der Lokalisation von NEMO im Zellkern, jedoch eine verringerte Expression im Zytoplasma. NEMO allerdings muss in das Zytoplasma translozieren, um durch Demaskierung der IκB Proteine dem Transkriptionsfaktor NFκB einen Transport in den Zellkern zu ermöglichen, wo dieser Targetgene des Zellüberlebenssignalweges aktivieren kann. So ist es fraglich, ob es möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Verlagerung von NEMO in das Zytoplasma kommt, und die Erhöhung im Zellkern doch auf eine Aktivierung des NEMO-PIDDosoms hinweist, die zur Resistenz beiträgt. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 6.3 diskutiert.

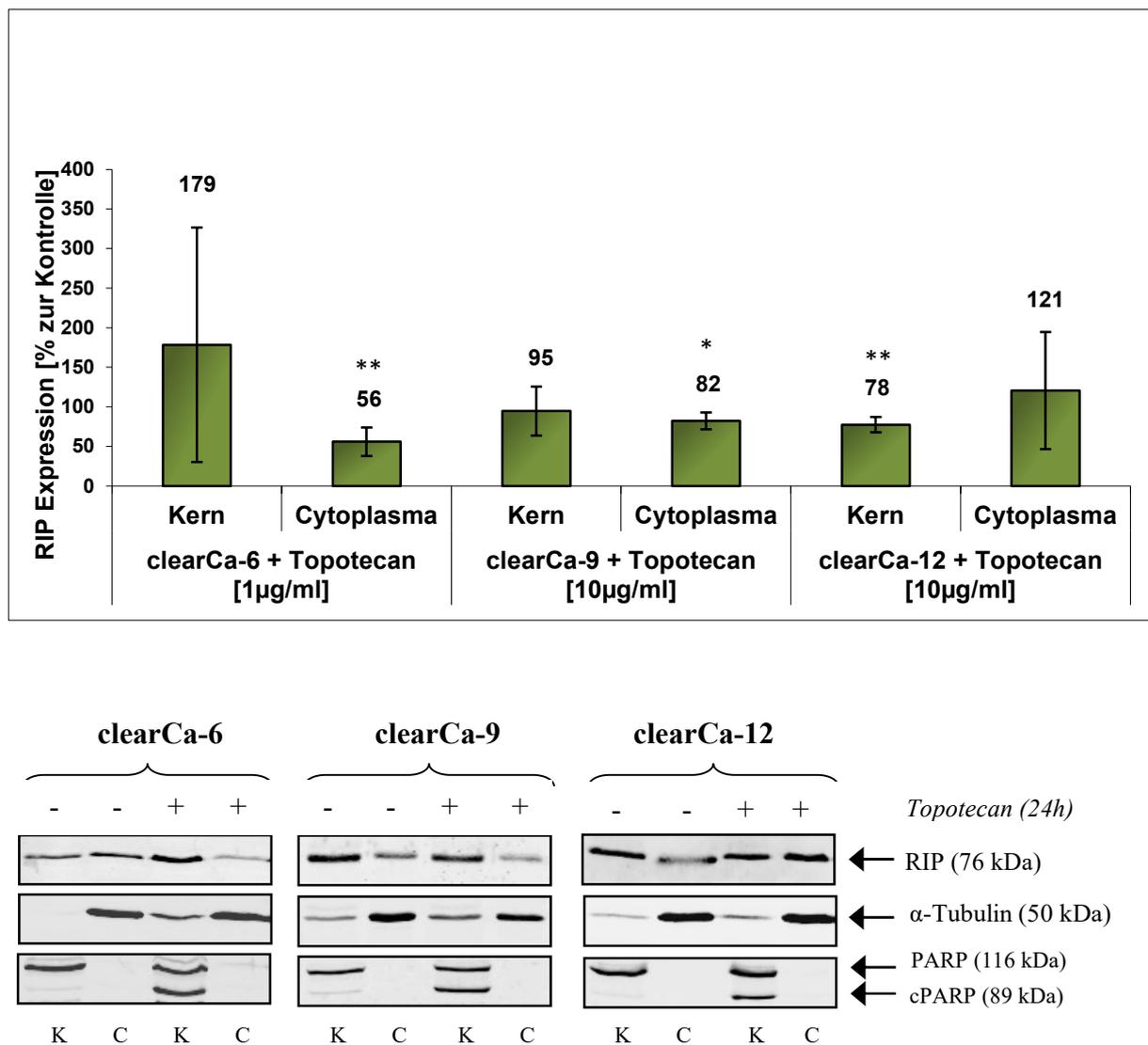


Abb.17: Fraktionierte Expression von RIP1 im Nierenzellkarzinom nach Applikation von Zytostatika (WB)
 Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des unten abgebildeten Western Blots zur Detektion von RIP1. Aufgetragen wurden 50µg fraktionierte Proteinlysate auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Reinheit der nukleären Fraktionierung, sowie die Apoptose wurde hier mittels Antikörper für das Kernprotein PARP und das apoptotische Spaltprodukt cleaved PARP (cPARP) überprüft, während α-Tubulin die Reinheit der cytoplasmatischen Fraktion zeigt sowie als Abgleich für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dient. Als Abgleich für die Kernfraktion wurde die Ponceau Färbung densitometrisch gemessen und in der Auswertung berücksichtigt. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h ["K": Kernfraktion; "C": Cytoplasmatische Fraktion]. Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

Neben den beiden aufgeführten Komplexen RAIDD-PIDDosom und NEMO-PIDDosom, an denen PIDD partizipiert, ist es wie bereits erwähnt an einem dritten Komplex beteiligt, der neben der DNA-Reparatur auch für den G2/M-Checkpoint vermittelten Zellzyklusarrest verantwortlich ist. Das sogenannte DNA-PKcs-PIDDosom beinhaltet neben PIDD die Caspase-2 und die katalytische Untereinheit DNA-PK, die an dem NHEJ-Signalweg, einem Mechanismus zur Reparatur eines DNA-Schadens, mitwirkt (Shi et al. 2009; Logette et al. 2011; Janssens & Tinel, 2012). Die Western Blot Analysen (s. Abb.18) zeigen erwartungsgemäß eine reine Kernlokalisierung der DNA-PKcs, die nach Apoptoseinduktion in allen untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien eine Abnahme der Expression präsentieren. clearCa-6 weist demnach einen hoch signifikanten Rückgang um 10% auf (90% im Vergleich zur Kontrolle), clearCa-9 die stärkste Abnahme um hoch signifikante 42% (58% im Vergleich zur Kontrolle) und clearCa-12 Zellen eine Abnahme um 29% (71% im Vergleich zur Kontrolle).

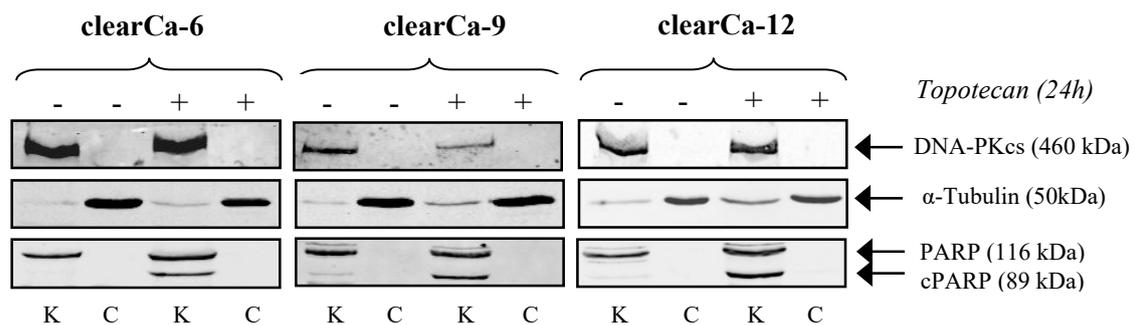
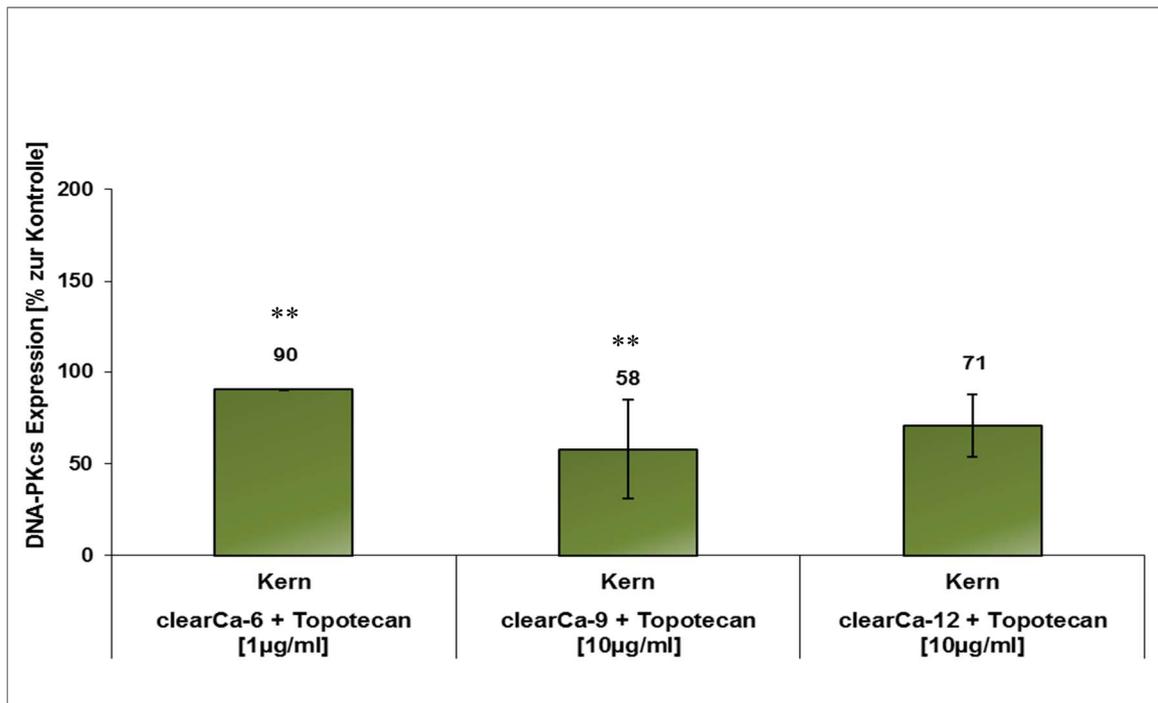


Abb.18: Fraktionierte Expression von DNA-PKcs im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB)

Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des unten abgebildeten Western Blots zur Detektion der DNA-PKcs. Zum Abgleich wurde Tubulin nachgewiesen. Aufgetragen wurden 50 µg fraktionierte Proteinlysate auf ein 5%iges SDS-Polyacrylamidgel. Aufgrund der Proteingröße der DNA-PKcs war es methodisch nicht möglich, die Reinheit der Fraktionen, sowie die Apoptose auf demselben Blot zu ermitteln. Daher wurden zusätzlich dieselben Lysate auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen um Tubulin und PARP sowie das apoptotische Spaltprodukt cleaved PARP (cPARP) zu detektieren. Die Auswertung bezieht sich jedoch auf die Ponceau Färbung des DNA-PKcs WB, welche densitometrisch berechnet wurde und als Abgleich für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dient. Behandelt wurde mit Topotecan für einen Zeitraum von 24h ["K": Kernfraktion; "C": Cytoplasmatische Fraktion]. Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

5.4 NFκB ist in p53 mutierten Nierenzellkarzinomzelllinien nach Zytostatikabehandlung aktiviert

NEMO ist als ein essentieller Faktor für die NFκB-Aktivierung beschrieben worden. Im Zytoplasma leitet es als regulatorische Untereinheit des IκB Kinasekomplexes (IKK Komplex) die Phosphorylierung und damit die Degradation der IκB (Inhibitor of NFκB alpha) Proteine ein, die den Transkriptionsfaktor NFκB im Zytoplasma an der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) maskieren und eine Translokation dieser in den Zellkern verhindern (Hayden et al. 2014; Polley et al. 2013). Infolge der Expressionsanalysen des NEMO-PIDDosoms nach Apoptoseinduktion wurde die Aktivierung des NFκB-Signalweges anhand des Verhältnisses von phosphorylierten zu unphosphorylierten IκBα Proteinen, die ein Teil des IKK Komplexes bilden, ermittelt. Die Daten aus Abbildung 19 zeigen nach Behandlung eine Aktivierung von NFκB in den p53 mutierten Zelllinien clearCa-6 und clearCa-9, dabei besonders stark in sensitiven clearCa-6 Zellen, während in clearCa-12 Zellen jedoch keine Aktivierung zu messen war. Demnach könnte die hier gemessene Aktivierung NEMO-unabhängig sein, da die Expressionsanalysen eine geringere Expression von NEMO im Zytoplasma von clearCa-6 wie auch clearCa-9 Zellen nach Behandlung zeigte (s. Abb.16). Dies könnte auf eine Beteiligung des alternativen NFκB-Signalweges hindeuten, was unter Kapitel 6.3 genauer erörtert wird.

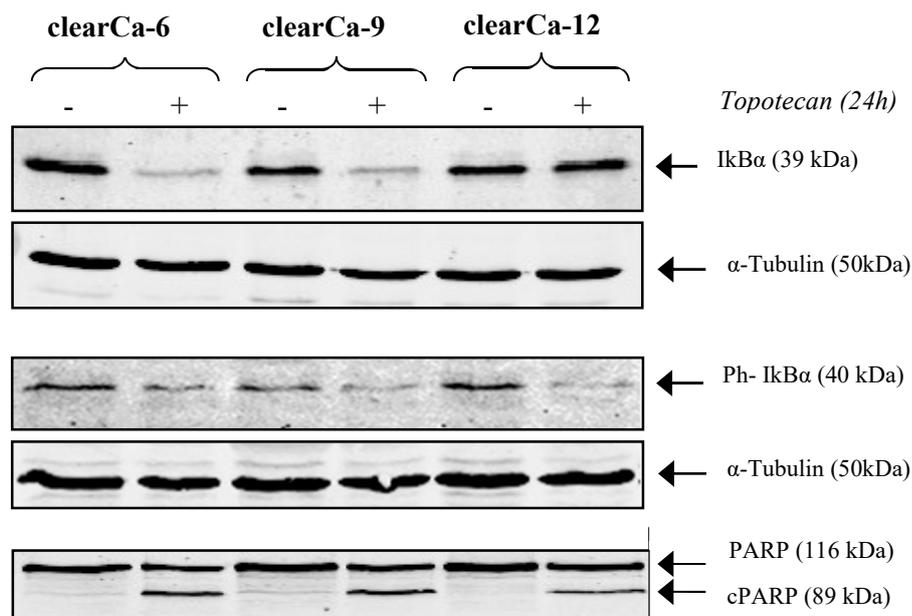
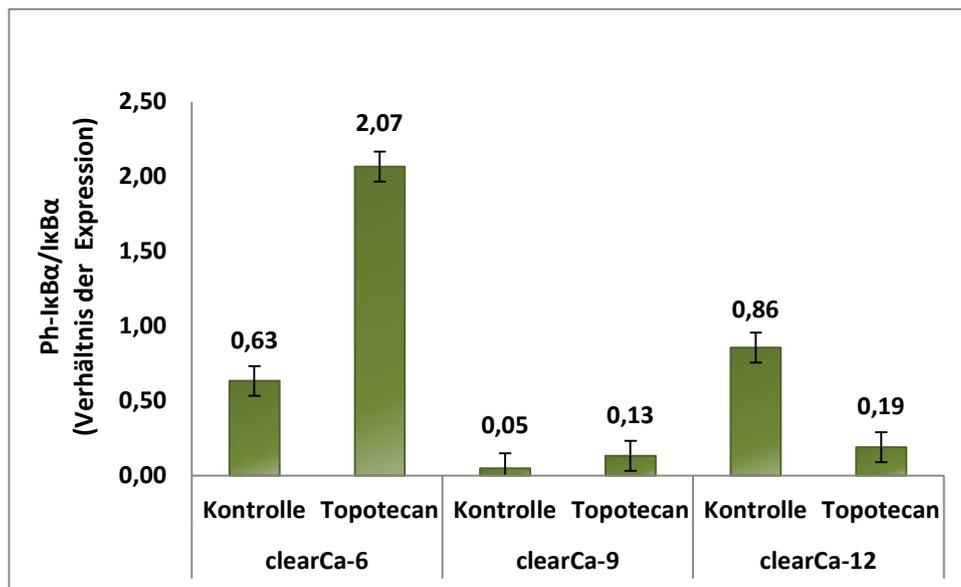


Abb.19: NF κ B-Aktivierung nach Behandlung mit Zytostatika im Nierenzellkarzinom (WB)

Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des abgebildeten Western Blots zur Detektion der NF κ B inhibierenden Proteine IkB α und dessen Phosphorylierungszustand. Es wurde das Expressionsverhältnis der phosphorylierten Proteine zu unphosphorylierten Proteinen unter Berücksichtigung des α -Tubulin-Abgleichs sowie der unbehandelten Kontrolle gebildet um Rückschlüsse auf die Aktivierung von NF κ B ziehen zu können. Außerdem zeigt das PARP-Spaltprodukt cPARP die Wirkung der Apoptose-auslösenden Konzentration des Zytostatikums Topotecan, was für 24h auf den Zellen inkubiert wurde. Aufgetragen wurden je 50 μ g Gesamtproteinlysate auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. $n \geq 3$.

5.5 Bestimmung der Transkriptmenge der PIDD-Isoformen im Nierenzellkarzinom

PIDD stellt einen molekularen Schalter zwischen der Apoptose und dem Zellüberlebenssignalweg NFκB dar. Die PIDD Isoformen unterscheiden sich darüber hinaus hinsichtlich ihrer pro- bzw. antiapoptotischen Wirkung, was die Bedeutsamkeit der Spleißvarianten im Zusammenhang mit einer Entstehung von Tumoren nochmals unterstreicht. Daher wurden hier quantitative Real Time PCR Programme etabliert, um die Expression der Isoformen in den verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinien, aber auch erstmals in humanen Nierenzellkarzinomen verschiedener Tumorstadien mit nativem Nierengewebe zu untersuchen und zu vergleichen. Um die Isoformen analysieren zu können, wurde die mRNA von PIDD-1 mittels spezifischer Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, während für PIDD-2, -3 und -4 Oligo(dT)₁₈ Primer verwendet werden konnten. Im selben Reaktionsansatz zu PIDD-1 wurde daher auch SDHA als Housekeepinggen spezifisch in cDNA umgeschrieben. Das Expressionsmuster der vier Isoformen ähnelt sich in den drei untersuchten Zelllinien des Nierenzellkarzinoms (s. Abb.20A): so zeigen nach Apoptose Induktion die Zellen der Linie clearCa-6, -9 und -12 eine erhöhte Expression aller vier PIDD-Isoformen, am stärksten jedoch von PIDD-2 und PIDD-3. Die resistenten clearCa-12 Zellen, die dennoch wildtypisch für p53 sind, zeigen dabei interessanterweise für alle Isoformen das stärkste Expressionslevel. PIDD-1, das sowohl Apoptose als auch NFκB aktivieren kann, weist eine gesteigerte Expression um 26% im Vergleich zur Kontrolle an. Das proapoptotisch wirksame Protein PIDD-4 ist um 37% verstärkt exprimiert. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist die p53 regulierende Wirkung auf PIDD-1 und PIDD-4. So weisen die Zelllinien clearCa-6 und clearCa-9, die eine p53 Mutation aufweisen, eine vergleichsweise geringere erhöhte Expression von PIDD-1 und -4 um 16% bzw. 15% auf. PIDD-2 besitzt im Gegensatz dazu ausschließlich eine antiapoptotische Wirkung indem es PIDD-1 inhibiert. clearCa-6 Zellen zeigen eine erhöhte Expression der mRNA um 73% auf, clearCa-9 um 49% und clearCa-12 sogar um signifikant 154% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ähnlich verhält es sich bei PIDD-3, das unterstützend zu PIDD-1 proapoptotisch wirkt. So ist hier eine erhöhte mRNA Menge in clearCa-6 um 87%, in clearCa-9 um 48% und in clearCa-12 um 188% zu messen. Bemerkenswert ist, dass die resistente Zelllinie clearCa-12 für alle PIDD Isoformen die

am meisten gesteigerte Expression zeigt. Möglicherweise sind die erhöhten Raten für PIDD-1 und -4 auf das intakte p53 System zurückzuführen. Aber auch das antiapoptotische PIDD-2 ist hier erhöht exprimiert, stärker auch als die Hauptform PIDD-1. Auf Proteinebene konnte hingegen lediglich PIDD-3 detektiert werden (s. Abb.14). PIDD-3 allein jedoch kann keine Apoptose induzieren, sondern wirkt nur verstärkend zusammen mit der Hauptform PIDD-1. Jedoch ist PIDD-3 bislang als diejenige Isoform beschrieben worden, die nach genotoxischem Stress erhöht exprimiert wird (Cuenin et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Beobachtung somit, dass PIDD-3 ebenfalls in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien sehr stark erhöht nach Topotecan Behandlung exprimiert wird. Ein Zusammenhang der PIDD Isoformen und den beobachteten Resistenzen in den untersuchten Zelllinien kann hier dennoch nicht beobachtet werden.

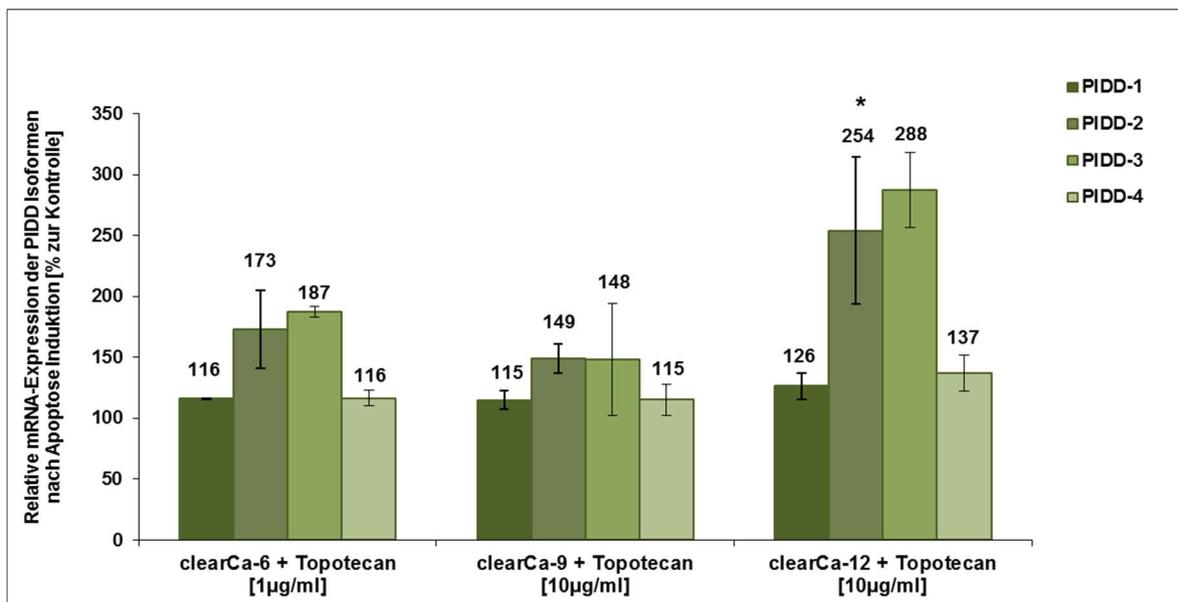


Abb.20.A: mRNA Expression der PIDD Isoformen 1-4 in Nierenzellkarzinomzelllinien (qRT-PCR)

Das obere Diagramm zeigt die Auswertung zur relativen Expressionsanalyse aus der quantitativen Real Time PCR von PIDD-1, -2, -3 und -4 in Nierenzellkarzinomzelllinien nach Apoptose Induktion (24h Behandlung mit Topotecan). Negativkontrollen wurden mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. $n \geq 3$.

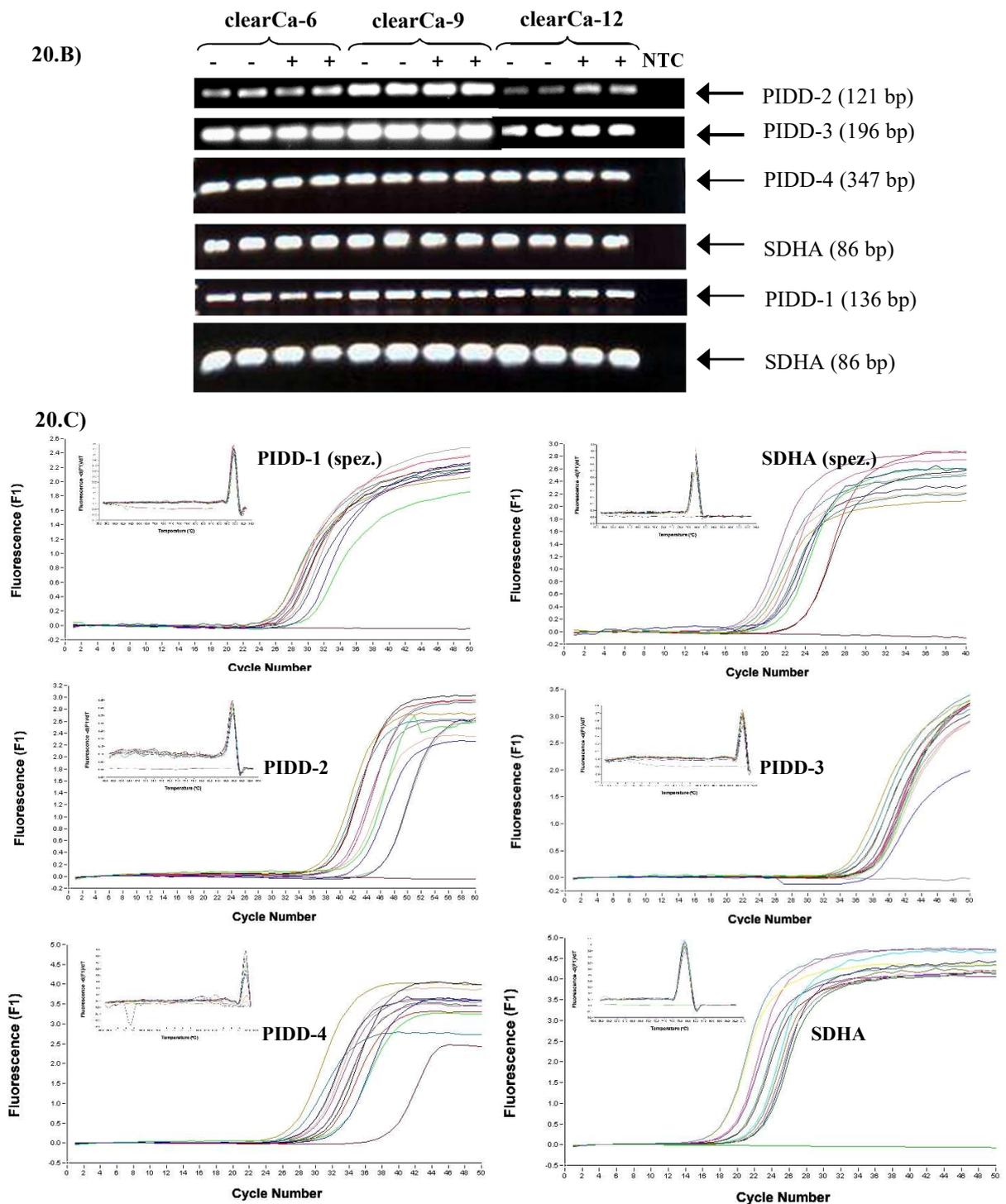


Abb.20.B) +C): mRNA Expression der PIDD Isoformen 1-4 in Nierenzellkarzinomzelllinien (qRT-PCR)
 Die obere Abbildung zeigt die Endpunktanalyse. Hier wurden die PCR Produkte der qPCR (Abb. 19.A) zur Überprüfung auf 1,5% Agarose aufgetragen. Als Housekeepinggen wurde SDHA gewählt und bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt. PIDD-1 wurde mittels spezifischer Reverse Transkription nachgewiesen, weshalb auch SDHA spezifisch in dieser Reaktion umgeschrieben wurde ["NTC": Non-Template Control]. Die unteren Abbildungen zeigen die Light Cycler Analysen mit der jeweiligen Schmelzpunktanalyse, die zur Spezifizierung des Produktes diente und die NTC stets negativ zeigte. Bei der NTC von PIDD-4 handelt es sich lediglich um Primer-Dimere, die in späteren Zyklen gebildet wurden. Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

Neben den Expressionsanalysen in den Nierenzellkarzinomzelllinien wurden die Isoformen PIDD-1 bis PIDD-4 auf mRNA Ebene erstmals auch in Nierengewebe verschiedener Tumorstadien untersucht und mit denen verglichen, die gesundes Nierengewebe aufweisen. So lässt sich bestimmen, ob tatsächlich alle PIDD Isoformen auch in nativem Tumorgewebe und nicht-neoplastischem Nierengewebe auf mRNA Ebene nachweisbar sind, welche Isoformen stärker exprimiert werden und ob sich das Verhältnis der Isoformen ändert. Da sich die Isoformen in ihrer Funktion deutlich unterscheiden, lässt dies möglicherweise Rückschlüsse auf Änderungen im Expressionskontext pro- und antiapoptotischer PIDD-Isoformen im Laufe der Tumorprogression zu.

Dafür wurden 24 Proben des gesunden, korrespondierenden Nierengewebes untersucht, 12 Proben von humanem Nierengewebe des Tumorstadiums pT1, 14 Proben pT2 Tumorgewebe und 10 Proben mit dem Status pT3. Die relative Expression der PIDD Isoformen wurde unter Berücksichtigung eines Abgleichs mit dem Housekeepinggen SDHA mit Hilfe des Mann-Whitney Tests auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum gesunden Nierengewebe ausgewertet (s. Abb.21). Es zeigte sich dabei eine signifikant veränderte Expression der Tumorstadien für die Expression von PIDD-1 und PIDD-4. Die relative Expression von PIDD-1, das sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen einnimmt, war in allen untersuchten Tumorstadien pT1, pT2 und pT3 im Vergleich zur gesunden Niere erniedrigt. Die zweite proapoptotische Isoform PIDD-4 hingegen nahm mit fortschreitendem Tumorstadium zu. Die antiapoptotische Form PIDD-2 war in den Tumorgeweben erhöht exprimiert während PIDD-3, welches PIDD-1 in seiner proapoptotischen Funktion unterstützt, in den Tumorgeweben pT1 und pT2 erhöht, in fortgeschrittenem Stadium pT3 allerdings vermindert.

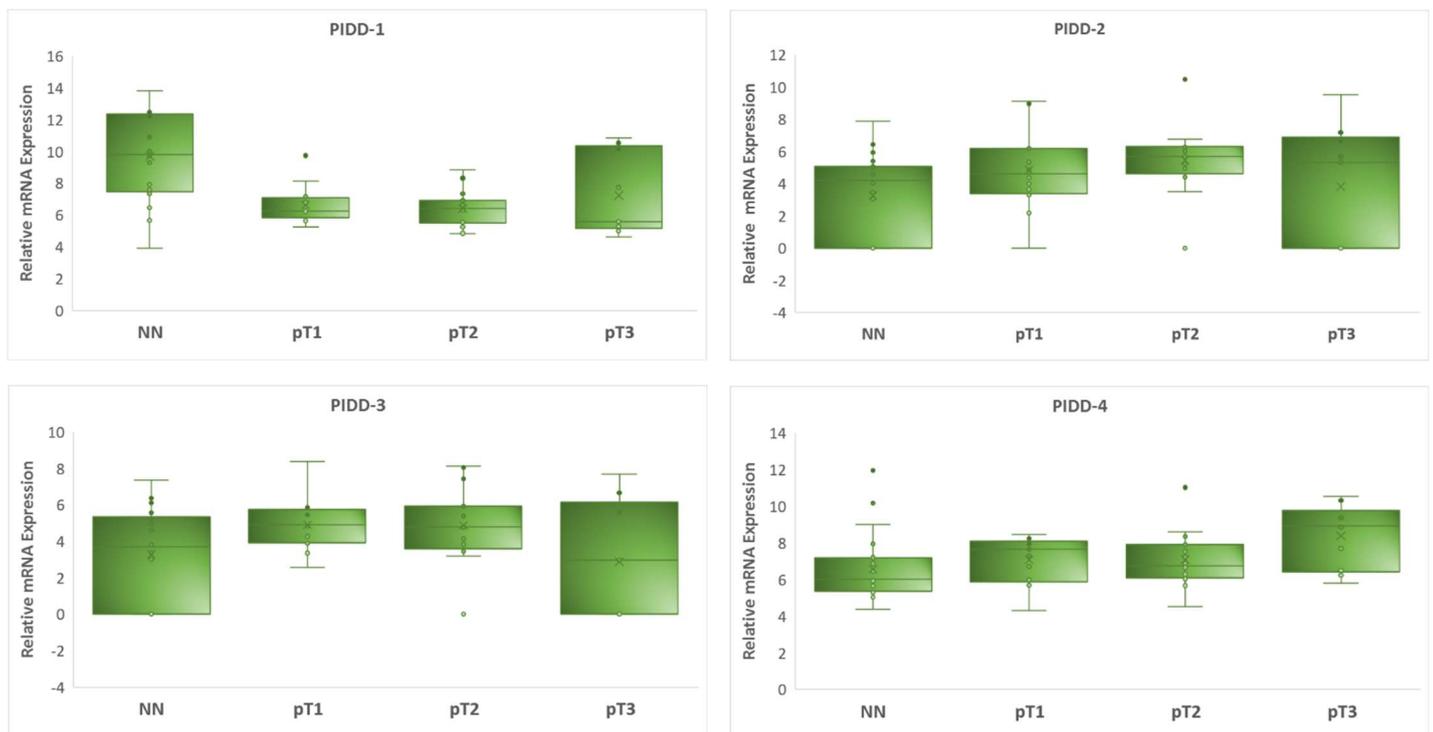


Abb.21: Relative mRNA Expression der PIDD Isoformen 1-4 im humanen Nierengewebe (qRT-PCR)

Die Diagramme zeigen die relative Expressionsanalyse aus der quantitativen Real Time PCR von PIDD-1, -2, 3 und -4 in humanem Nierengewebe der Tumorstadien pT1, pT2 und pT3 sowie in gesundem Nierengewebe unter Berücksichtigung der Expression von SDHA als Housekeepinggen. Die Reverse Transkription erfolgte für PIDD-1 mit spezifischen Primern, während PIDD-2, -3 und -4 mit Oligo(dT)₁₈ Primern in cDNA umgeschrieben wurde. Die Berechnung der Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney Test durchgeführt (exemplarische Darstellung der PIDD-qPCR s. Abb.20.B) und 20.C)). Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

5.6 Caspase-2 knockdown führt zu einer erhöhten Caspase-3 Aktivität in humaner Nierenzellkarzinomzelllinie

Caspase-2 ist zwar eine der ersten identifizierten Caspasen, jedoch wird ihre Funktion kontrovers diskutiert und konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Als Bestandteil des RAIDD-PIDDosoms, welches die Apoptose induzieren kann, sowie des DNA-PKcs-PIDDosoms, das am NHEJ-Pathway zur DNA-Reparatur beteiligt ist, kommt ihr in dieser Arbeit eine besondere Fragestellung zu. Die Nierenzellkarzinomzelllinie clearCa-6 zeigte die höchste Aktivierung der Caspase-2 nach Induktion der Apoptose (s. Abb.9). Um funktionelle Fragestellungen beantworten zu können, wurden Caspase-2 knockdown Zellen der Linie clearCa-6 generiert (s. Abb.22). Nach Apoptose Stimuli wurden diese auf die weitere

Caspasen-Kaskade Aktivierung hin analysiert, um eine mögliche Beteiligung der Caspase-2 an deren Aktivität beobachten zu können. Die durchflußzytometrischen Messungen der Aktivität der Effektorcaspase-3/-7 zeigte interessanterweise eine deutlich gesteigerte Aktivierung bereits lediglich durch den knockdown der Caspase-2 bedingt (s. Abb.23). Die Negativkontrolle, Zellen, die mit einer scrambled siRNA behandelt wurden, zeigten eine basale Aktivität der Caspase-3 von 6,9%, während Caspase-2 knockdown Zellen mit 52,2% eine Erhöhung der Aktivität um 45,3% beobachtet werden konnte. Nach Behandlung mit dem Zytostatikum Topotecan in Apoptose-auslösender Konzentration verstärkte sich der Effekt hier nochmals durch den Funktionsverlust der Caspase-2. So zeigte die Kontrolle nach Behandlung eine Aktivierung von 16,8%, während apoptotische Caspase-2 knockdown Zellen eine Aktivität von 54,5% aufwiesen. Das Ergebnis deutet damit auf eine eher antiapoptotische Funktion der Caspase-2 in den Nierenzellkarzinomzelllinien hin, was bislang noch nicht beschrieben wurde und eine neue Rolle der Caspase-2 zukommen lässt. Die Caspase-2 zeigte auf die Aktivität der Initiatorcaspasen-8 und -9 einen sehr ähnlichen Effekt, wenn auch nicht so markant ausgeprägt. Bereits der knockdown von Caspase-2 führte zu einer gering verstärkten basalen Aktivierung der Initiatorcaspasen, die nach Apoptose Induktion nochmals anstieg. Auch diese Daten zeigen einen bislang nicht bekannten Effekt der Caspase-2 auf die weitere Caspasen-Kaskade, der unerwarteterweise auf eine inhibierende Funktion hindeutet.

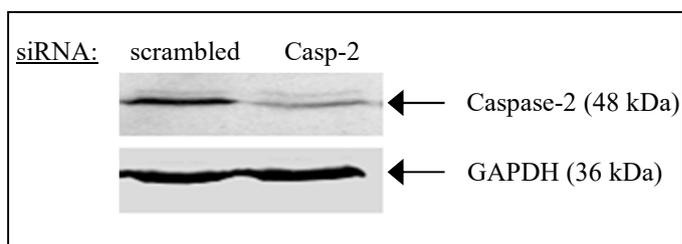


Abb.22: Caspase-2 knockdown in clearCa-6 Zellen

Der Western Blot zeigt den effizienten knockdown der Caspase-2 nach 72h Behandlung mit siRNA in der Nierenzellkarzinomzelllinie clearCa-6. Als Abgleich einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinmenge dient das Housekeepinggen GAPDH. Aufgetragen wurden je 50µg Gesamtlysate auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. n≥3.

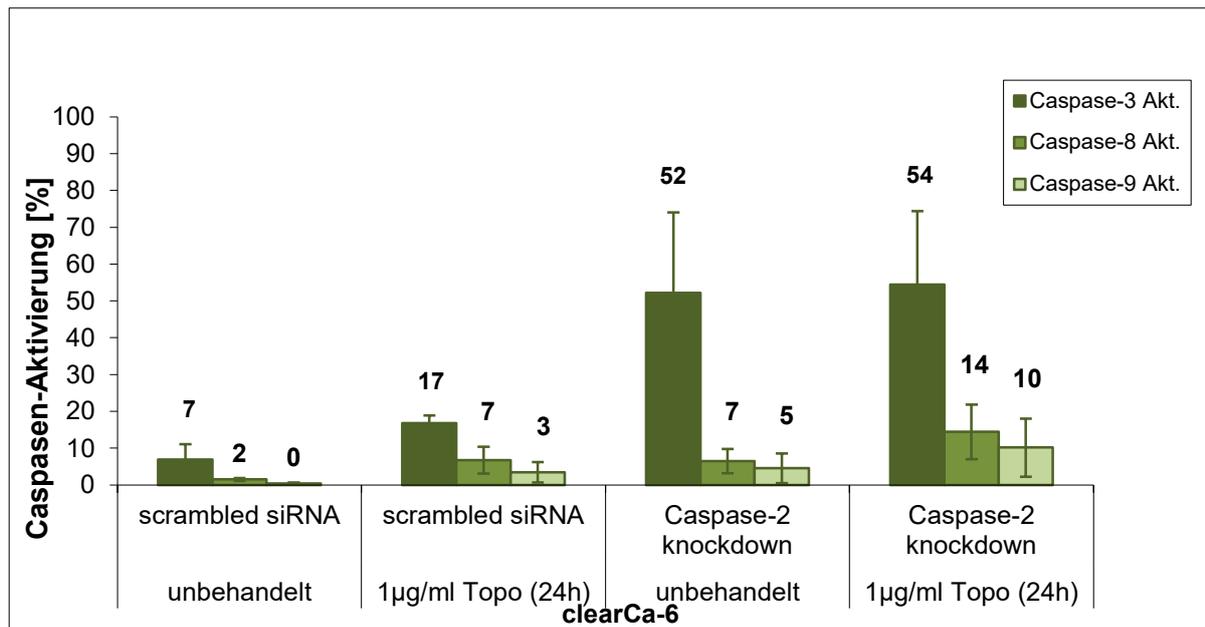


Abb.23: Die Rolle der Caspase-2 in der Caspasen-Aktivierung im Nierenzellkarzinom (FCM)
Das Säulendiagramm zeigt die Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen zur Aktivität der Caspasen-3/-7, -8 und -9 in Caspase-2 knockdown Zellen der Linie clearCa-6. Die scrambled siRNA dient als Negativkontrolle. Die Behandlung der siRNA's geschah über einen Zeitraum von 72h mit einer Endkonzentration von 25nM. Die Behandlung mit Zytostatikum über einen Zeitraum von 24h ["Topo": Topotecan]. Unbehandelte Zellen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. n≥3.

5.7 Caspase-2 nimmt Einfluss am G2/M-vermitteltem Zellzyklusarrest im humanen Nierenzellkarzinom

Caspase-2 ist Teil des DNA-PKcs-PIDDosoms, welches am NHEJ-Pathway partizipiert und an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Inwieweit die Caspase-2 nun aber am G2/M-Checkpoint und der Zellzykluskontrolle involviert ist, ist Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Bislang beschrieben ist ein Einfluss der Caspase-2 auf den G2/M-Checkpoint von Shi et al. in MEF's (Shi et al. 2009). In den generierten Caspase-2 knockdown Nierenzellkarzinomzellen der Linie clearCa-6 (s. Abb.22), die die höchste Beteiligung der Caspase-2 nach Apoptose Induktion zeigten (s. Abb.9), wurde der Anteil des phosphorylierten Histons H3 (Ser10) mittels spezifischer, farbgekoppelter Antikörper im Durchflußzytometer bestimmt. Da phosphoryliertes Histon H3 (Ser10) an der Chromosomenkondensation und damit am Eintritt der Zelle in die Mitose beteiligt ist, während unphosphoryliertes Histon H3 für die

Akkumulation der Zellen im G2/M-Checkpoint verantwortlich ist, kann dadurch der Anteil der Zellen in der Mitose gemessen werden. Die hier durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass die Caspase-2 eine Rolle am G2/M-vermitteltem Zellzyklusarrest einnimmt. Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, zeigten die Nierenzellkarzinomzellen dabei eine höhere Mitoserate in Caspase-2 knockdown Zellen, in denen zuvor Apoptose induziert worden war, als in Zellen, die Caspase-2 exprimierten. Die Caspase-2 knockdown Zellen zeigten trotz Behandlung mit Topotecan als Apoptose Stimuli eine erhöhte Mitoserate als Zellen, die lediglich mit einer scrambled siRNA behandelt wurden und Caspase-2 exprimierten. Im Vergleich dazu wurde eine Zunahme des phosphorylierten Histons H3 (Ser10) um 13,05% gemessen. Damit konnte erstmals im Nierenzellkarzinom dargestellt werden, dass der Caspase-2 eine Bedeutung im Zellzyklusarrest zukommt.

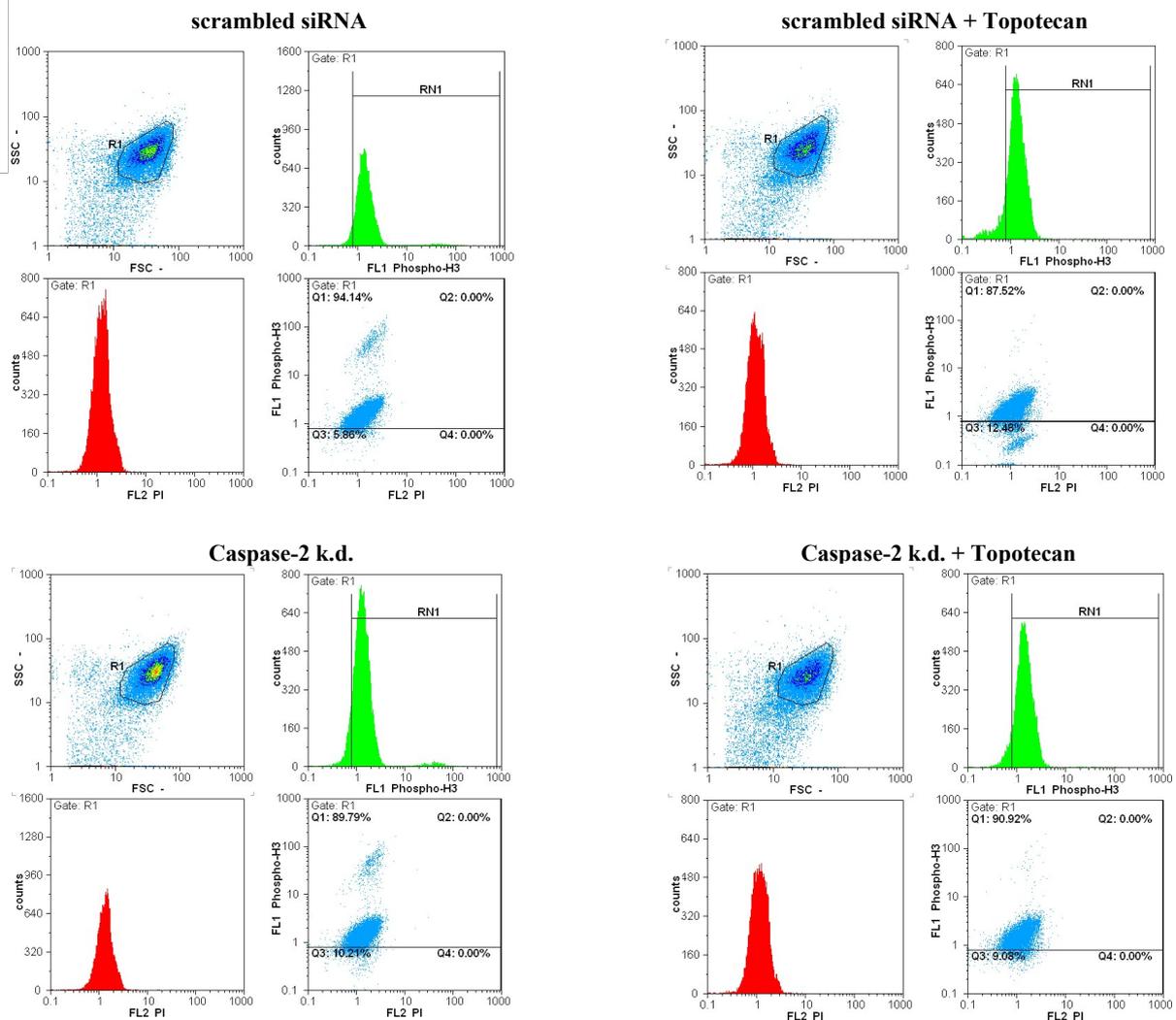


Abb.24: Die Rolle der Caspase-2 am G2/M-vermitteltem Zellzyklusarrest (FCM)
 Die Abbildung zeigt exemplarisch eine durchflußzytometrische Messung in clearCa-6 Nierenzellkarzinomzelllinien zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des Histons H3 (Ser10) in Kanal FL1. Außerdem wurden die Zellen mit PI gefärbt (Kanal FL2). Man sieht, dass die Zellpopulationen sich nach Apoptose Induktion durch Topotecan im Dotplot verschieben. Eine Isotypkontrolle wurde mitgeführt und in der Auswertung berücksichtigt. Das Gate RN1 bzw. die Eigenfluoreszenz wurde im Vorfeld mittels ungefärbter Proben eingestellt (hier nicht dargestellt). Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Lösungsmittel für Topotecan (PBS) inkubiert. $n \geq 3$.

6. Diskussion

Das Verständnis der molekularen Prozesse von Apoptose und Zellüberlebenssignalwegen ist von fundamentaler Bedeutung für die Entstehung von Tumoren und deren Therapiemöglichkeiten. PIDD stellt als molekularer Schalter zwischen Apoptose und NFκB einen möglichen Kandidaten dar, dem eine solche Bedeutung zukommen könnte. Je nach Interaktion und Lokalisation bildet es unter anderem mit Caspase-2, Multiproteinkomplexe aus, die an dem programmierten Selbstmordprogramm bzw. an Zellüberlebenssignalwegen beteiligt sind. Da das Nierenzellkarzinom bislang hinsichtlich seiner ausgeprägten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika noch unzulänglich verstanden ist, wurden hier die beiden Proteine PIDD - und seine Spleißvarianten - sowie Caspase-2 nach ihren möglichen Funktionen innerhalb der Apoptose, des NFκB Weges und für die Zellzykluskontrolle untersucht. Vor allem die Caspase-2 ist bezüglich ihrer Funktion kontrovers diskutiert und scheint sehr vielfältig zu sein. Auch die Existenz der vier PIDD Isoformen, die unterschiedliche Funktionen betreffend der Apoptose haben, und zudem teilweise p53 reguliert sind, machen das System noch komplexer. Dies führte zur Fragestellung ob es im Verlauf fortgeschrittener Tumorstadien des humanen Nierenzellkarzinoms eine veränderte Expression der vier PIDD Isoformen gibt, die Ansätze einer neuen Strategie in der Tumorthherapie erlauben. Das Verständnis der molekularen Prozesse und Regulationen könnte jedoch für die Entwicklung neuer Therapien neuartige Angriffspunkte darstellen.

6.1 Die Beteiligung der Initiator- und Effektorcaspasen an der Zytostatika-induzierten Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom

Um erste Erkenntnisse über die Signalwege zu bekommen, wurden zunächst die Zellen mit dem DNA-schädigendem Chemotherapeutikum Topotecan, einem Topoisomerase I Hemmer, in verschiedenen Konzentrationen für definierte Zeitpunkte behandelt und die Apoptoserate bestimmt. Dies erfolgte einerseits im Western Blot anhand der PARP-Spaltung, so wie durch

Bestimmung der Caspase-3 Aktivität im Durchflußzytometer. PARP (Poly [ADP-ribose] polymerase) ist ein in der DNA-Reparatur involviertes, nukleäres Enzym, das während apoptotischer Prozesse von der Effektorcaspase-3 gespalten wird. Das im Western Blot detektierbare Spaltprodukt eignet sich daher als zuverlässiger Apoptosemarker. In der sensitiven Zelllinie clearCa-6 konnte bereits bei einer Konzentration von 1µg/ml Topotecan nach 24 Stunden deutlich das PARP-Spaltprodukt detektiert werden, während die beiden resistenteren Linien clearCa-9 und clearCa-12 erst bei höheren Konzentrationen von 10µg/ml bei gleicher Inkubationszeit das Spaltprodukt eindeutig aufwiesen (s. Abb.7). Die Caspase-3 Aktivierung zeigte ein ähnliches Verhalten: so konnte in der sensitiven Zelllinie schon bei der geringeren Konzentration [1µg/ml] eine Aktivierung von ca. 40% gemessen werden, während die Aktivität der Caspase-3 in den resistenten Zelllinien auch bei höherer Konzentration des Zytostatikums lediglich bei 10 bzw. 8% [10µg/ml] lag (s. Abb.8). Die Beteiligung weiterer Caspasen (Caspase-2, -8 und -9) an der durch Topotecan-induzierten Apoptose wurde ebenfalls im Durchflußzytometer gemessen. So zeigte sich in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 eine signifikante Aktivierung vor allem der Caspase-2, aber auch eine schwächere Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -9. Die resistenteren Zelllinien clearCa-9 und -12 wiesen eine deutlich schwächere Aktivierung der Caspase-2, sowie eine noch geringere Induktion der Caspasen-8 und -9 auf (s.Abb.9). Inwieweit die Caspase-2 hier als Initiatorcaspase für die Aktivierung weiterer Caspasen fungiert, war ein Ziel dieser Arbeit. So wurde der Frage nachgegangen, ob die beobachtete Aktivierung der Initiatorcaspasen - der an der mitochondriellen Apoptose beteiligten Caspase-9 sowie der am extrinsischen Signalweg beteiligten Caspase-8 - im Nierenzellkarzinom auf die Aktivierung der Caspase-2 zurückzuführen ist. Zusammenfassend kommt der Caspase-2 offenbar eine besondere Rolle bei der Apoptoseregulation in Nierenzellkarzinomen zu und wird unter Kapitel 6.4 genauer erörtert.

6.2 Expression der PIDDosomen-Mitglieder in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien unterschiedlicher Resistenzen nach Apoptose Induktion

Für die Untersuchungen zur Bedeutung des PIDDosoms und der Caspase-2 im klarzelligen Nierenzellkarzinom wurden drei Zelllinien gewählt, die sich in ihrem p53 Mutationsstatus unterscheiden: eine vergleichsweise sensitive Zelllinie mit p53 Mutation und intaktem p53 System (clearCa-6) sowie zwei resistenteren Zelllinien, davon eine mit gestörter p53 Funktion mit Mutation (clearCa-9) und eine mit gestörter p53 Funktion ohne Mutation von p53 (clearCa-12). Nachdem die Apoptose auslösende Konzentration für die jeweiligen Nierenzellkarzinomzelllinien ermittelt wurden, konnte die Expression der PIDDosomen-Mitglieder auf ihre Existenz und Lokalisation hin, sowie auf mögliche Änderungen in der subzellulären Lokalisation nach Zytostatika Behandlung hin mittels Western Blot untersucht werden.

Fraktionierte Proteinexpressionsanalysen dieser Arbeit zeigen die Procaspase-2 in allen drei untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien präsent. Nach Apoptose Induktion ging die Expression jedoch zurück, mit Ausnahme in der Kernfraktion der sensitiven Zelllinie clearCa-6 (s. Abb.13). Die Caspase-2 ist in ihrer Funktion bislang noch umstritten und scheint vielfältig zu sein. In vergangenen Arbeiten konnte anhand mRNA Analysen demonstriert werden, dass sie eine der ersten Caspasen nach Apoptose Induktion im Nierenzellkarzinom ist, die aktiviert wird (Heikaus et al. 2010). Die Proteinexpression nimmt jedoch bis auf Ausnahme in der sensitiven Zelllinie ab. Das lässt eine Regulation durch miRNAs wahrscheinlich erscheinen. Da es sich jedoch trotz Verwendung einer 0,2µM Nitrocellulosemembran als methodisch problematisch erwies, die Spaltprodukte im Western Blot zu detektieren, die auf apoptotische Prozesse rückschließen lassen, können für den Nachweis der Aktivierung nur die durchflußzytometrischen Messungen herangezogen werden (s. Abb.9). Hier zeigte unterstützend zu den Western Blot Daten die sensitive Zelllinie clearCa-6 die höchste Aktivierung nach Apoptose Induktion, während diese in den beiden resistenten Linien sehr gering ausfiel.

Vor allem die Isoform PIDD-1 stellt den molekularen Switch zwischen Zelltod und Zellüberleben dar: So kann das Spaltprodukt PIDD-C zusammen mit RIP1 und NEMO im Nukleus NFκB induzieren (Janssens et al., 2005). PIDD-CC hingegen bildet mit Caspase-2 und RAIDD einen Proteinkomplex im Zytoplasma, wo es die Apoptose aktiviert (Tinel & Tschopp, 2004). Allerdings existieren wahrscheinlich daneben auch alternative Systeme, die Caspase-2 und PIDD in ihrer tumorregulierenden Wirkung unabhängig von RAIDD machen (Peintner et al. 2015). Außerdem ist es mit der DNA-PKcs und Caspase-2 im Zellkern am NHEJ beteiligt (Shi et al., 2009). Die Autoproteolyse von PIDD wird dabei durch das Chaperone Hsp90 reguliert (Tinel et al. 2010). Die Isoformen PIDD-2, -3 und -4 wurden zwar bereits hinsichtlich ihrer pro- bzw. antiapoptotischen Funktion beschrieben, sind jedoch bislang nur wenig untersucht. Da das Verständnis der molekularen Prozesse in Tumoren allerdings unabhömmlich zu deren Bekämpfung ist, wurde hier erstmals im humanen Nierenzellkarzinom die Proteinexpression von PIDD und dessen Interaktionspartnern analysiert, die eine entscheidende Rolle bei Apoptosedefekten einnehmen könnten. Western Blot Daten der sensitiven und resistenten Nierenzellkarzinomzelllinien unterschiedlichen p53 Mutationsstatus zeigten, dass ausschließlich PIDD-3 exprimiert ist (s. Abb. 14). PIDD-3 allein kommt bislang keine proapoptotische Rolle zu. Lediglich kann es PIDD-1 in seiner proapoptotischen Funktion unterstützen (Cuenin et al. 2008; Pick et al. 2006). PIDD-3 kann aber den NFκB-Signalweg aktivieren. Allerdings beruhen die Studien, die die Aktivierung der Apoptose durch PIDD und Caspase-2 nach DNA-Schaden zeigen konnten, möglicherweise auf einen Effekt der durch deren Überexpression bzw. eines irreparablen DNA-Schadens zurückzuführen sind. Co-Immunopräzipitationen wären daher für die Zukunft wünschenswert, um beantworten zu können, ob das hier detektierte PIDD-3 an der Bildung der beschriebenen PIDDosomen beteiligt ist. Denkbar ist auch ein Apoptosedefekt durch das in den Nierenzellkarzinomzelllinien fehlende PIDD-1.

Das proapoptotische RAIDD-PIDDosom ist im Zytoplasma lokalisiert und setzt sich aus dem gespaltenen PIDD-CC, RAIDD und Caspase-2 zusammen (Tinel & Tschopp 2004). Als Adapterprotein mit einer Todesdomäne (DD) sowie einer Caspase-rekrutierenden Domäne (CARD) interagiert RAIDD mit PIDD und Caspase-2. Die Western Blot Analysen fraktionierter

Proteinlysate der untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien zeigten die Hauptlokalisierung von RAIDD erwartungsgemäß im Zytoplasma. Allerdings zeigten die beiden resistenten Zelllinien clearCa-9 und -12 nach Apoptose Induktion eine verringerte Expression im Zytoplasma. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass auch weniger Caspase-3 Aktivität gemessen werden konnte als in der sensitiven Linie clearCa-6, die eine stärkere Apoptose bei geringeren Konzentrationen des Zytostatikums Topotecan durchliefen. Denn dort zeigte sich RAIDD im Zytoplasma verstärkt akkumuliert. Im Nukleus wurde hingegen nur ein geringer Teil detektiert. In der sensitiven Zelllinie clearCa-6, die auch im Zytoplasma eine erhöhte Akkumulation von RAIDD nach Behandlung aufwies, zeigte sich ebenfalls ein enormer Anstieg im Nukleus, was auf eine erhöhte Expression unter apoptotischen Bedingungen rückschließen lässt mit folgendem Export in das Zytoplasma. Zwar wiesen auch Zellen der resistenten Linie clearCa-12 im Zellkern eine vergleichsweise geringere verstärkte Expression von RAIDD auf. Die hier verringerte Ansammlung im Zytoplasma könnte daher auf einen fehlerhaften oder verhinderten Export in das Zytoplasma hindeuten. Auch eine Inhibierung des RAIDD-PIDDosoms bzw. ein proteolytischer Abbau von RAIDD ist denkbar. So ist es vorstellbar, dass die ausgeprägte Resistenz in den beiden Linien clearCa-9 und -12 in einem Zusammenhang mit einer verringerten Expression und Lokalisation von RAIDD im Zytoplasma steht, welches dort in seiner eigentlichen Funktion zusammen mit PIDD und Caspase-2 die Apoptose induzieren kann. RAIDD wurde erstmals 2001 in Zusammenhang mit Tumoren gebracht (Hofmann et al. 2001). Dort fand man eine Herabregulierung von RAIDD in Mantelzelllymphomen, die zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gehören. Diese Beobachtungen und die Existenz des RAIDD-PIDDosoms (Tinel & Tschopp 2004) unterstützen die These, die hier anhand der beobachteten Zunahme von RAIDD in der sensitiven Linie im Zytoplasma und der Abnahme in den resistenten Linien aufgestellt werden kann. Dem gegenüber gibt es allerdings auch eine Studie, die eine Multidrug-Resistenz in Osteosarkomazellen direkt mit RAIDD in Verbindung brachten (Yang et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit allerdings konnte lediglich PIDD-3 in den untersuchten Nierenzellkarzinomen detektiert werden, welches nicht selbstständig die Apoptose induzieren kann, sondern nur zusammen mit PIDD-1 und darüber hinaus an der Aktivierung von NFκB beteiligt ist. So ist es fraglich, ob sich in den hier untersuchten Nierenzellkarzinomzellen das klassisch beschriebene RAIDD-PIDDosom bildet

und benötigt weitere Untersuchungen in Form von Immunopräzipitationen. Annahmen in der Forschung tendieren eher zu der Annahme, dass RAIDD nicht hauptsächlich durch die direkte Aktivierung der Caspase-2 eine Rolle in der Apoptose zukommt, sondern mehr durch Unterdrückung der NFκB Aktivierung sowie der Produktion von Cytokinen (Lin et al. 2012; Qiao et al. 2014). Dies können die Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht direkt unterstützen, da hier insbesondere in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 eine Aktivierung von NFκB gemessen werden konnte (s. Abb.19). Dennoch ist die sensitive Zelllinie clearCa-6 diejenige, die auch die stärkste Apoptose bzw. höchste Caspase-3 Aktivierung nach Induktion aufwies (s. Abb.8). Dieser Sachverhalt lässt sich aber gerade anhand der Sensitivität erklären, da es in Zellen stets zu einer simultanen Aktivierung beider Signalwege führt: sowohl Apoptose als auch Zellüberlebenssignalwege werden aktiviert, letztendlich entscheiden Faktoren wie beispielsweise das Ausmaß der DNA-Schädigung darüber, was überwiegen muss. Ob nun RAIDD im weiteren Verlauf daran beteiligt ist, dass es dann doch zu apoptotischen Prozessen durch Unterdrückung von NFκB kommt, müssen weitere Experimente zeigen.

Die DNA-PKcs ist als katalytische Untereinheit der DNA-PK an der Formation des DNA-PKcs-PIDDosoms zusammen mit Caspase-2 und PIDD beteiligt (Shi et al. 2009). Im Nukleus aktiviert dieser Komplex, der auch am G2/M Checkpoint des Zellzyklus beteiligt ist, den NHEJ-Signalweg, ein DNA-Reparaturmechanismus. Nukleäre Caspase-2 wird nach eintretendem DNA-Schaden binnen kürzester Zeit gespalten und aktiviert (Zhivotovsky et al. 1999). In der Studie von Shi et al. 2009 konnte gezeigt werden, dass Schäden am Erbgut eine Erhöhung aktiver Caspase-2, die an dem DNA-PKcs-PIDDosom gebunden ist, zur Folge haben. Die Phosphorylierung der Caspase-2 geschieht dabei durch die DNA-PKcs. Die Western Blot Daten fraktionierter Lysate der Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen die DNA-PKcs im Zellkern lokalisiert, wo sie nach Zytostatika Behandlung in allen drei untersuchten Zelllinien eine zum Teil hoch signifikant verringerte Expression aufwies (s. Abb.18). Vermutlich ist die verringerte Expression der DNA-PKcs hier auf ein irreparables Maß an DNA-Schädigung zurückzuführen. Ob die DNA-PKcs, die im Zellkern das maßgebliche Protein darstellt, das mit PIDD interagiert, auch mit der hier detektierten Isoform PIDD-3 einen Komplex bildet, stellt eine weitere interessante Frage auf, die es zukünftig noch abzuklären gilt. Anhand

Immunopräzipitationen der DNA-PKcs sowie Feststellung des Phosphorylierungsstatus der nukleären Caspase-2 (Serin 122) ließen sich Rückschlüsse auf die Komplexbildung mit PIDD-3 und Caspase-2 ziehen, sowie den Einfluss der DNA-PKcs auf die Aktivierung der Caspase-2, die in dieser Arbeit nicht ohne Zweifel als proapoptotischer Kandidat deklariert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht möglich, dem nachzugehen. Allerdings wurde die Beteiligung der Caspase-2 an dem G2/M-Checkpoint vermittelten Zellzyklusarrest untersucht, die ebenfalls mit der DNA-PKcs in Verbindung steht (s. Kapitel 6.4.1).

Das Protein NEMO bildet als sogenannter NFκB-essentieller Modulator zusammen mit dem Spaltprodukt PIDD-C, das mittels seiner DD direkt mit RIP1 interagiert, das NEMO-PIDDosom, welches im Zellkern an der Aktivierung des NFκB-Zellüberlebensweges beteiligt ist (Janssens et al. 2005). Sowohl NEMO als auch RIP1 konnten in den untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien erfolgreich nachgewiesen werden (s. Abb.16 und 17). Dabei zeigten sie sich im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Während sowohl NEMO als auch RIP1 in der sensitiven Linie clearCa-6 unter apoptotischen Bedingungen eine Verschiebung in den Zellkern mit einhergehender Abnahme im Zytoplasma aufwies, war sowohl NEMO als auch RIP1 im Zellkern der resistenten Linie clearCa-9 verringert exprimiert. Auch im Zytoplasma der clearCa-9 Zellen war nochmals eine stärkere Abnahme beider Proteine zu messen. Die resistente Linie clearCa-12 hingegen zeigte eine noch stärkere Verschiebung von NEMO in den Zellkern während der Apoptose, ähnlich der Linie clearCa-6, allerdings eine Verschiebung von RIP1 in das Zytoplasma. Die Erhöhung von RIP1 und NEMO im Zellkern der sensitiven Linie könnte auf eine verstärkte Bildung des NEMO-PIDDosoms hinweisen. Zwar sind Zellen der Linie clearCa-6 der Zytostatika Behandlung sehr sensitiv gegenüber und weisen die höchste Caspase-3 Aktivierung sowie eine deutliche PARP-Spaltung auf, was ein maßgeblicher Nachweis der Apoptose ist. Da jedoch anfänglich sowohl Apoptose als auch Zellüberleben aufgrund eines genotoxischen Schadens aktiviert werden, könnte gerade diese Sensitivität den Anstieg im Zellkern erklären. Die höchste Expression von NEMO im Zellkern zeigten allerdings die resistenten Zellen der Linie clearCa-12. Es muss jedoch erwähnt werden, dass für die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges eine Translokation von NEMO in das Zytoplasma als essentiell beschrieben wurde (Polley et al. 2013). Möglicherweise ist dieser

Shift erst zu einem späteren Zeitpunkt zu messen, oder aber ein alternativer NFκB Signalweg ist induziert worden, der unabhängig von NEMO ist. Man geht mittlerweile von mindestens drei unterschiedlichen NFκB Wegen aus (Gilmore 2006). Möglicherweise sind es noch mehr, die bislang noch nicht identifiziert werden konnten. Außerdem ist lediglich NEMO im Zellkern der Linie clearCa-12 verstärkt exprimiert, nicht aber der andere Bestandteil des NEMO-PIDDosoms, RIP1. Daher kann hieraus kein Hinweis entnommen werden, dass die Resistenz in den Linien clearCa-12 und clearCa-9 an eine abnormale gesteigerter Bildung des NEMO-PIDDosoms mit folgender verstärkter NFκB Aktivierung gekoppelt zu sein scheint. Darüber hinaus konnte anhand des Phosphorylierungsstatus der IκBα-Proteine in der Linie clearCa-12 keine NFκB-Aktivierung gemessen werden (s. Abb. 19).

Zusammenfassend hinsichtlich der Expression der PIDDosomen Mitglieder - basierend auf die drei PIDDosomen Komplexbildung der aktuellen Literatur - zeigen die hier untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien eine zelllinienspezifische Expression. Die PIDDosomen Mitglieder werden in allen drei Zelllinien exprimiert, wobei in Anbetracht der Resistenzen eine Tendenz der Abnahme der Proteine nach Apoptose Induktion in den beiden resistenten Linien zu beobachten ist. Lediglich bei PIDD bzw. NEMO konnte in einer der resistenten Linien eine Zunahme detektiert werden. Allerdings konnte in allen untersuchten Zelllinien keine vollständige Zunahme der Mitglieder des RAIDD-PIDDosoms detektiert werden, welches an der Apoptose beteiligt ist. Denkbar ist auch ein Zusammenhang zwischen der fehlenden Hauptform PIDD-1 in den Nierenzellkarzinomzelllinien und deren Apoptose Resistenz.

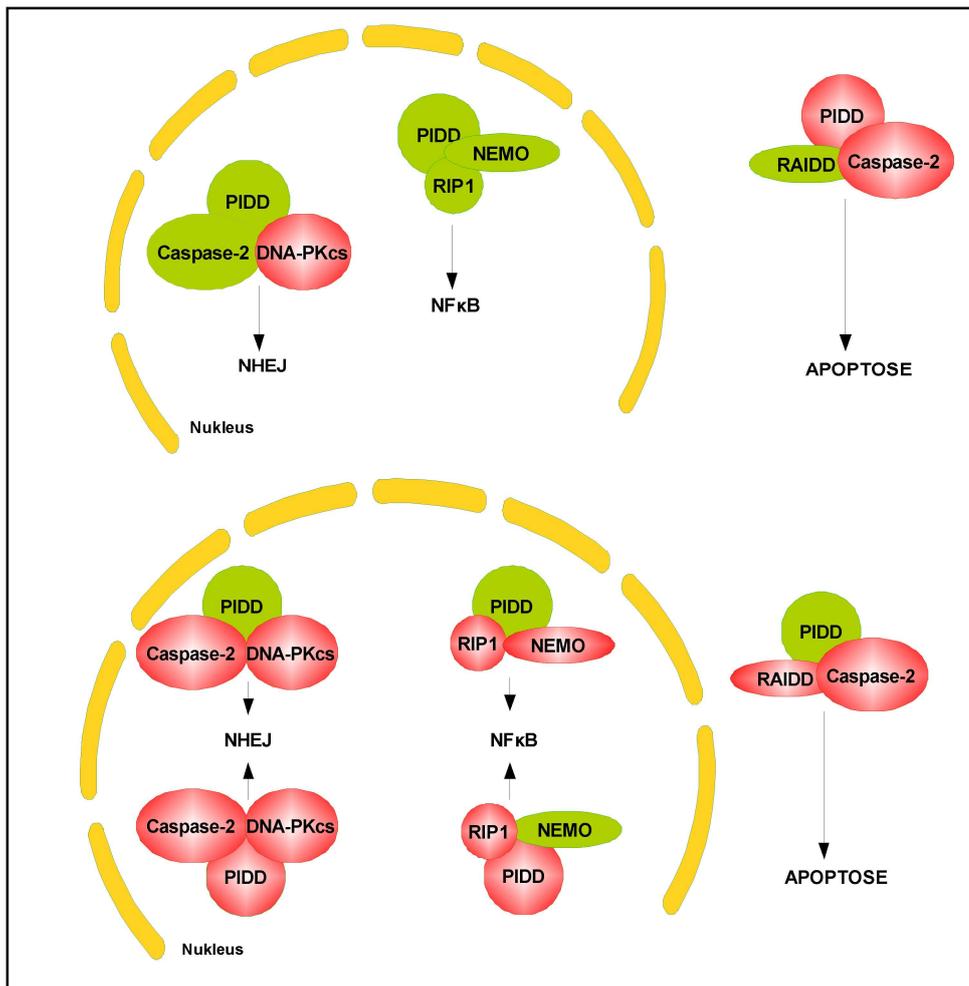


Abb.25: Schematische Darstellung der Expression der PIDDosomen Mitglieder im humanen Nierenzellkarzinom Der obere Teil der Abbildung verbildlicht die Expressionsanalysen fraktionierter Lysate in der sensitiven Zelllinie clearCa-6. Der untere Teil stellt die Proteinexpression der beiden resistenten Linien clearCa-9 (oberer Teil) und clearCa-12 (unterer Teil) dar. Rot dargestellte Proteine zeigen dabei eine gemessene Abnahme des Proteins nach Zytostatika Behandlung, während grün einen Anstieg zeigt. Die Interaktionen der Proteine wurden hier nicht untersucht, sondern basieren auf veröffentlichte Studien.

6.3 Die NFκB Aktivierung im Nierenzellkarzinom im Hinblick auf das NEMO-PIDDosom

Für die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges, der für das Zellüberleben von Bedeutung ist, ist NEMO als ein essentieller Faktor beschrieben worden. Nach Translokation von NEMO aus dem Nukleus ins Zytoplasma ist NEMO an der Phosphorylierung der IκB Proteine beteiligt, die anschließend degradiert werden. Die Transkriptionsfaktoren NFκB werden somit nicht länger an der NLS durch IκB Proteine maskiert und können in den Zellkern

translozieren und die Genexpression regulieren (Hayden et al. 2014; Polley et al. 2013). Anhand des Phosphorylierungsstatus der I κ B α Proteine konnte in den Nierenzellkarzinomzelllinien nach Zytostatika Behandlung mit einer Mutation im p53 Gen (clearCa-6 und clearCa-9) eine Aktivierung von NF κ B festgestellt werden (s. Abb.19). Besonders stark war die Aktivierung in der sensitiven Zelllinie clearCa-6. Die resistente Zelllinie clearCa-12, die p53 wildtypisch ist, aber dennoch ein gestörtes p53 System aufweist, zeigte hingegen keine Aktivierung von NF κ B. Interessanterweise zeigen die Expressionsanalysen, dass in den Nierenzellkarzinomzelllinien NEMO im Zytoplasma nach Behandlung verringert war (s. Abb.16). Daraus lässt sich eine NEMO-unabhängige NF κ B Aktivierung in diesen Zelllinien schließen, die möglicherweise auf einen alternativen Signalweg zur NF κ B Aktivierung beruht. Zwar weisen die Linien clearCa-6 und -12 einen Anstieg von NEMO im Zellkern auf. Da aber die Sumoylierung von NEMO, die durch PIDD gesteuert wird und die Translokation zur Folge hat, binnen weniger Minuten geschieht, kann man ausschließen, dass es möglicherweise zu einem späteren als den gemessenen Zeitpunkt zu einem Anstieg von NEMO im Zytoplasma kommt (Blackwell et al. 2013). Auch das Expressionsprofil von RIP1 und NEMO, die zusammen mit PIDD den Komplex bilden, der NF κ B aktivieren kann, unterscheidet sich. So weist einzig die sensitive Zelllinie clearCa-6 einen Anstieg von RIP1 im Nukleus auf ebenso wie von NEMO, wenn auch gering. Ob es dennoch zu der Interaktion der Proteine RIP1, NEMO und PIDD in den Nierenzellkarzinomzelllinien kommt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Fraglich ist auch, ob die in den Nierenzellkarzinomzelllinien exprimierte Isoform PIDD-3 ebenso an der Sumoylierung von NEMO beteiligt ist. Möglicherweise konnte deswegen hier NEMO in keiner der untersuchten Linien im Zytoplasma erhöht detektiert werden. Man geht heute davon aus, dass mehrere verschiedene Signalwege der NF κ B Aktivierung existieren. Bislang konnte man neben dem kanonischen Weg einen alternativen Signalweg identifizieren, der NEMO-unabhängig ist. Hierbei kommt es nach Rezeptoraktivierung durch die MAP3-Kinase NIK zur Phosphorylierung des IKK Komplexes, was die Freisetzung der NF κ B Transkriptionsfaktoren zur Folge hat (zusammengefasst in Gilmore, 2006). Die Daten legen nahe, dass in den Nierenzellkarzinomzelllinien ein alternativer Weg der NF κ B Aktivierung besteht, den es zu untersuchen gilt, um eventuelle fehlerhafte Regulationen des Zellüberlebensweges feststellen zu können.

6.4 Die funktionelle Bedeutung der Caspase-2 im Nierenzellkarzinom

Die Rolle der Caspase-2 als Initiator- bzw. Effektor-Caspase ist bis heute noch nicht abschließend geklärt: sie scheint je nach zellulärem Kontext zu variieren. Man geht mittlerweile davon aus, dass die Funktionen der Caspase-2 vielfältig sind und sie neben der Apoptose auch für den Zellzyklus oder als Tumorsuppressoren eine bedeutende Rolle einnehmen könnte (Shi et al., 2009; Puccini et al. 2013). Es konnte bereits auf Transkriptionsebene eine Hochregulation von Gesamt-Caspase-2 mRNA während der Tumorprogression von Nierenzellkarzinomen demonstriert werden, während sich auf Proteinebene interessanterweise gleichzeitig eine Abnahme der Caspase-2 Proteinexpression zeigte (Heikaus et al. 2010). Außerdem war die Caspase-2 die erste der Caspasen, die in der Zytostatika-induzierten Apoptose in Nierenzellkarzinomen aktiviert wird. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung der Caspase-2 für die Aktivierung weiterer Caspasen und ihre Rolle im Zellzyklus zu klären. Die sensitive Zelllinie clearCa-6 wies die höchste Caspase-2 Aktivität nach Zytostatika Behandlung auf (s. Abb.9). Daher wurde diese Zelllinie für die funktionellen Versuche gewählt, die im Folgenden diskutiert werden, und ein Caspase-2 knockdown etabliert. Das grundlegende Verständnis der Beteiligung der Caspase-2 an apoptotischen Prozessen kann in Zukunft ein Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Strategien in der Tumorthherapie darstellen.

6.4.1 Die Caspase-2 und ihre Rolle am G2/M-Checkpoint im Zellzyklus

Die Caspase-2 ist neben ihrer Lokalisation im Zytoplasma konstitutiv im Nukleus exprimiert und bildet mit der DNA-PKcs und PIDD das DNA-PKcs-PIDDosom, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Colussi et al. 1998; Zhivotovsky et al. 1999; Shi et al. 2009). In den hier generierten Caspase-2 knockdown Nierenzellkarzinomzelllinien wurde daher die Beteiligung der Caspase-2 in dem G2/M-Checkpoint vermittelten Zellzyklusarrest untersucht. Die Ergebnisse bestätigten erstmals die Rolle der Caspase-2 an dem Zellzyklusarrest im Nierenzellkarzinom. So wurde sogar unter Bedingungen einer Apoptose-auslösender

Konzentration des Zytostatikums Topotecan in Caspase-2 knockdown Zellen eine erhöhte Mitoserate gemessen als in Zellen die Caspase-2 exprimierten (s. Abb.24). Damit bestätigen diese Ergebnisse die Studie von Shi et al., 2009, in der erstmals in MEF-Zellen die Beteiligung der Caspase-2 am Zellzyklus gezeigt werden konnte. Dort wurde die Phosphorylierung der Caspase-2 an Serin 122 durch die DNA-PKcs nach induziertem DNA-Schaden verantwortlich gemacht, die darüber hinaus durch PIDD getriggert werden kann. Weitere Studien dazu fehlen bis heute, und es bleibt eine weitere Frage nach möglichen Caspase-2 downstream Substraten, die am G2/M-Checkpoint und am NHEJ beteiligt sind. Bislang konnten nur wenige Substrate identifiziert werden, darunter das proapoptotische Protein Bid und PARP-1 (Gao et al. 2005; Gu et al. 1995). So bleibt für die Zukunft noch zu klären, ob die Regulatoren, die durch Caspase-2 gespalten werden, einen Funktionsverlust oder Funktionsgewinn mit sich bringen (Shi et al. 2009).

6.4.2 Der Einfluss der Caspase-2 auf die Aktivierung weiterer Caspasen

Neben der beschriebenen Funktion der Caspase-2 innerhalb der Kontrolle des Zellzyklus nimmt man an, dass ihr eine Rolle als Tumorsuppressorgen zukommt. Beispielsweise führt der Verlust des Chromosoms 7q bei Patienten mit einer AML (akute myeloische Leukämie), auf dem das Gen lokalisiert ist, zu sehr schlechten Prognosen (Johansson et al. 1993; Kumar et al. 1995; Mrozek 2008). Auch eine Inhibierung der Apoptose als Folge eines Caspase-2 knockdowns in Melanomzellen konnte beschrieben werden (Mhaidat et al. 2007). Weitere Studien belegen eine mögliche Rolle der Caspase-2 innerhalb der p53-abhängigen Apoptose. So weisen Caspase-2 defiziente Mäuse gegenüber verschiedenen Arzneistoffen eine abnormale Apoptose auf (Manzl C. et al., 2009). Auch eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium getriggert durch nukleäre Caspase-2 wurde beschrieben (Paroni et al. 2001). So scheint zusammenfassend einiges für die proapoptotische Beteiligung der Caspase-2 zu sprechen, wenngleich noch völlig unklar ist, wo genau die Caspase-2 einzuordnen ist, auch wenn es Hinweise auf eine Funktion als Initiatorcaspase gibt (Imre et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher in Caspase-2 defizienten Zellen der Nierenzellkarzinomzelllinie

clearCa-6 die Beteiligung der Caspase-2 auf die weitere Caspasen-Kaskade hin untersucht. Unerwarteterweise zeigten Caspase-2 knockdown Zellen eine deutlich erhöhte Aktivierung insbesondere der Effektorcaspase-3, aber auch der Initiatorcaspasen-8 und -9. Dieser Effekt verstärkte sich nochmals nach Apoptose Induktion (s. Abb.23). Eine derartige Beobachtung, die eher eine antiapoptotische Wirkung der Caspase-2 im humanen Nierenzellkarzinom vermuten lässt, ist bislang noch nicht beschrieben worden. Es ist allerdings bekannt, dass die Regulation der Caspase-2 durch Phosphorylierungen vorgenommen wird: So kann die Caspase-2 durch Phosphorylierung an Serin 157 innerhalb ihrer Prodomäne durch die PKCK2 (Protein Kinase Casein Kinase 2) inhibiert werden. Dementsprechend aktiviert die Dephosphorylierung der Caspase-2 die TNF-induzierte Apoptose in Tumorzellen (Shin et al. 2005). Eine denkbare Erklärung für das hier beobachtete Phänomen ist daher der Phosphorylierungsstatus der Caspase-2 im humanen Nierenzellkarzinom, da dieser möglicherweise auch weitere inhibierende Wirkungen auf die Caspase-3, -8 und -9 haben könnte. Untersuchungen dazu wären daher äußerst interessant, da ein antiapoptotischer Einfluss der Caspase-2 bisher nicht beschrieben werden konnte. Auch Mutationsanalysen mit folgender Beeinträchtigung der normalen Funktion der Caspase-2 im humanen Nierenzellkarzinom wären zur weiteren Klärung aufschlussreich. Da allerdings die Caspase-2 im Allgemeinen in der Literatur kontrovers hinsichtlich ihrer Funktionen diskutiert wird, und ihr offenbar eine zahlreiche Vielfalt verschiedenster Aufgaben in der Zelle zukommen, wäre auch eine spezifisch im humanen Nierenzellkarzinom denkbare antiapoptotische Rolle der Caspase vorstellbar. Diesen Sachverhalt weiter aufzulösen könnte somit eine vielversprechende Grundlage zum Verständnis des humanen Nierenzellkarzinoms und seine Behandlung bieten, da bereits der knockdown in den untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien eine drastisch verstärkte Apoptose aufwies.

6.5 Das multifunktionale Protein PIDD im humanen Nierenzellkarzinom

Als molekularer Schalter zwischen Apoptose und Zellüberlebenssignalwegen könnte PIDD von großem Interesse in der Tumorforschung sein. Die vier bislang bekannten Isoformen sind teils

p53-induzierbar und unterscheiden sich darüber hinaus in ihrer Funktion hinsichtlich der Apoptose bzw. der Aktivierung des NFκB-Weges. Nach dem ersten Schritt, der Klärung der Proteinexpression der PIDD-Isoformen im humanen Nierenzellkarzinom (s. Abb.14), wurde mittels eigens etablierter quantitativer Real Time PCR die Expression der einzelnen Isoformen nach Apoptose Induktion in den Nierenzellkarzinomzelllinien sowie in Nierengewebe verschiedener Tumorstadien untersucht. Die Auswertung erfolgte vergleichend zu unbehandelten Zelllinien bzw. gesundem Nierengewebe.

6.5.1 Transkription der PIDD-Isoformen in Nierenzellkarzinomzelllinien nach Apoptose Induktion

In den Nierenzellkarzinomzelllinien konnte lediglich die Isoform PIDD-3 auf Proteinebene detektiert werden. PIDD-3 ist charakterisiert als Isoform, die lediglich unterstützend zu PIDD-1 Apoptose auslösen kann, jedoch nicht allein. Zudem kann PIDD-3 auch noch den NFκB-Weg induzieren (Cuenin et al., 2008). Die Analysen der quantitativen Real Time PCR zeigen jedoch eine Expression aller vier bislang identifizierten PIDD-Isoformen (s. Abb.20). Dabei war PIDD-3 die nahezu am stärksten exprimierte Isoform in den mit Zytostatika behandelten Nierenzellkarzinomzelllinien: die resistente Zelllinie clearCa-12 (p53 wt, jedoch gestörtes p53 System) wies die stärkste Expression auf, die resistente Linie clearCa-9 (p53 mut, gestörtes p53 System) exprimierte PIDD-3 nahezu gleichstark wie PIDD-2 und Zellen der sensitiven Linie clearCa-6 (p53 mut, dennoch intaktes p53 System) exprimierten ebenfalls PIDD-3 stärker als die anderen Isoformen. Die antiapoptotische Isoform PIDD-2, wurde in den Zelllinien interessanterweise ebenfalls stärker exprimiert als PIDD-1 und PIDD-4. PIDD-4, der bislang ausschließlich eine proapoptotische Wirkung zugeschrieben wurde, wurde in den Linien clearCa-6 und -9 gleichstark wie PIDD-1 exprimiert, in clearCa-12 etwas stärker als PIDD-1. PIDD-1 kann sowohl Apoptose als auch NFκB aktivieren. Das Expressionsmuster der vier Spleißvarianten ähnelt sich somit in allen untersuchten Zelllinien. Die Tatsache, dass alle vier Isoformen auf mRNA Ebene nachzuweisen sind, jedoch nur PIDD-3 als Protein im Western Blot zu detektieren ist, könnte durch eine Regulation durch miRNAs gesteuert sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PIDD-3 am stärksten vorhanden ist. Da jedoch die Hauptform als Protein in den Nierenzellkarzinomzelllinien nicht exprimiert ist, kann PIDD-3 keine proapoptotische unterstützende Rolle einnehmen. Möglicherweise kommt ihm in diesen Zellen somit ausschließliche antiapoptotische Rolle durch Aktivierung des NFκB-Weges zu. Erwähnenswert ist auch der Zusammenhang zum p53 Status der Zelllinien: so weisen die Zelllinien mit einer Mutation im p53 Gen (clearCa-6 und -9) eine vergleichsweise geringere erhöhte Expression der Hauptform PIDD-1 aber auch PIDD-4 auf, die beide eine proapoptotische Wirkung besitzen. Diese Daten weisen somit für das Nierenzellkarzinom erste Anhaltspunkte auf, die es als lohnend erscheinen lassen, die Regulation durch miRNAs zu überprüfen bzw. die Beteiligung von PIDD-3, der hier vorherrschenden antiapoptotischen Isoform an der Aktivierung des NFκB-Weges zu überprüfen.

6.5.2 Die Transkription der PIDD-Isoformen während der Tumorprogression im Vergleich zu gesundem Nierengewebe

Eine besonders interessante Fragestellung war die Expression der bislang kaum untersuchten PIDD Isoformen auf mRNA Ebene in humanen Nierentumorgewebe den Stadien pT1, pT2 und pT3. So sollte die Erkennung eines möglichen Zusammenhangs einer veränderten Expression der Spleißvarianten, die teils pro- teils aber auch antiapoptotische Funktionen haben, mit der Tumorprogression möglich werden. Untersucht wurden dazu insgesamt 36 Proben aus Nierentumorgewebe sowie 24 Proben korrespondierendem gesundem Nierengewebe. Die beiden Isoformen PIDD-1 und PIDD-4, die Apoptose auszulösen im Stande sind (Telliez et al. 2000; Cuenin et al. 2008; Huang et al. 2011), zeigten dabei eine signifikant veränderte Expression in den Tumorstadien im Vergleich zu gesundem Nierengewebe (s. Abb.21). So ist PIDD-1, welches am RAIDD-PIDDosom an der Apoptoseinduktion beteiligt ist, in den Stadien pT1- pT3 verringert, PIDD-4 hingegen erhöht exprimiert. Da in den meisten Tumoren Apoptosedefekte für ihre Entstehung verantwortlich sind, wäre ein nächster Schritt die Untersuchung der PIDDosom-Komplexbildung insbesondere des RAIDD-PIDDosoms, das Apoptose induzieren kann. Die Isoform PIDD-4 besitzt ebenfalls eine Death Domain und kann

einen höheren Anteil des PIDD-CC Fragmentes bilden, welcher in der Lage ist mit RAIDD und Caspase-2 zu interagieren (Huang et al. 2011). Auch interessant ist die erhöhte Expression der antiapoptotischen Spleißvariante PIDD-2 (Cuenin et al. 2008; Pick et al. 2006), die PIDD-1 inhibieren kann und des Weiteren den NFκB-Weg induziert. Daher ist ein Zusammenhang zwischen PIDD und der ausgeprägten Resistenz des humanen Nierenzellkarzinoms gegenüber Chemotherapeutika durchaus denkbar und könnten durch weitere Untersuchungen neue Grundlagen zum molekularen Verständnis des Nierenzellkarzinoms und deren Entwicklung neuartiger Therapien beitragen.

6.6 Perspektiven

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum einen, dass die Caspase-2 im humanen Nierenzellkarzinom an der Vermittlung des Zellzyklusarrest beteiligt ist und darüber hinaus scheint sie eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung weiterer Caspasen zu haben. Da Caspasen eine Schlüsselfunktion in der Apoptose übernehmen, und sich die Caspase-2 in vergangenen Studien als eine der ersten aktivierten Caspasen im RCC zeigten, sind weitere Untersuchungen zur Caspase-2 erstrebenswert die zur Aufklärung der ausgeprägten Resistenz des humanen RCC's führen könnten. Die Expressionsanalysen der PIDDosomen Mitglieder in Zelllinien des humanen RCC's im Hinblick auf die Resistenzmechanismen zeigten, dass nur die Isoform PIDD-3 als Protein exprimiert wird, jedoch auf mRNA Ebene alle vier Spleißvarianten transkribiert werden. Dies führt zu der Fragestellung, ob PIDD-3 in Interaktion mit den bekannten PIDDosomen Mitgliedern tritt, die in den hier untersuchten Zelllinien exprimiert werden, und ob die anderen Isoformen möglicherweise durch miRNAs reguliert werden. Die Expressionsanalysen in Nierengewebe verschiedener Tumorstadien zeigten die antiapoptotische Isoform PIDD-2 als erhöht exprimiert. Weitere Analysen darüber könnten Aufschluss geben und so neue Ansätze liefern, die für die Therapie relevant sein könnten.

7. Zusammenfassung

Das humane Nierenzellkarzinom weist eine Apoptose- und Therapieresistenz auf, dessen Ursachen bislang noch nicht verstanden werden konnten. Zahlreiche Proteine sind an den Signalwegen der Apoptose beteiligt. Eines dieser Proteine, PIDD, kann als molekularer Schalter zwischen Apoptose und Zellüberlebenssignalwegen fungieren, zwei elementare Prozesse in der Zelle, deren Dysregulation zur Tumorgenese bzw. Resistenz beitragen können. Im Hinblick darauf wurden in dieser Arbeit in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien, die sich hinsichtlich ihrer Resistenz und p53 Status unterscheiden, die PIDDosomen Mitglieder untersucht. Von zentraler Bedeutung waren neben der Expressionsanalyse der PIDDosomen Mitgliedern die funktionelle Bedeutung der Caspase-2 für den Zellzyklus und die Aktivierung weiterer Caspasen, sowie die Expression der Isoformen PIDD-1 bis PIDD-4 in Tumorstadien des humanen RCC's.

So konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die Isoform PIDD-3 translatiert wird, die den NFκB-Signalweg aktivieren kann und somit zum Zellüberleben beiträgt. PIDD-3 ist weiterhin auch als proapoptotisch beschrieben, wirkt jedoch nur in unterstützender Weise zu der proapoptotischen Hauptform PIDD-1, die jedoch in den hier untersuchten Zelllinien nicht detektiert werden konnte und der demzufolge hier keine Bedeutung für die Apoptose zukommt. Alle weiteren Mitglieder der PIDDosomen Komplexe, die entweder Apoptose im Zytoplasma induzieren (RAIDD-PIDDosom), den NFκB Weg im Nukleus aktivieren (NEMO-PIDDosom) oder an dem DNA-Reparaturweg NHEJ beteiligt sind (DNA-PKcs-PIDDosom) sind in allen drei Nierenzellkarzinomzelllinien exprimiert. Die resistenten Zelllinien neigen zu einer verringerten Expression der PIDDosomen Mitglieder nach Apoptose Induktion. Die sensitive Zelllinie konnte allerdings keine Zunahme aller Proteine, die an den PIDDosomen beteiligt sind, aufweisen. So scheinen die PIDDosomen Mitglieder und der p53 Status unabhängig voneinander zu wirken. Das Fehlen von PIDD-1 sowie die Abnahme einiger proapoptotischen Mitglieder des RAIDD-PIDDosoms könnten an der Resistenzentwicklung im RCC beteiligt sein. Hervorzuheben ist auch die Zunahme der antiapoptotischen Isoform PIDD-2 in insgesamt 36 untersuchten Proben Nierentumorgewebe verschiedener Tumorstadien im Vergleich zu

gesunder Niere (24 Proben), die mit einer Abnahme der proapoptotischen Hauptform PIDD-1 einhergeht. PIDD-4, welches unabhängig im Zytoplasma Apoptose auslösen kann, konnte allerdings signifikant erhöht während steigender Tumorprogression gemessen werden.

Die Aktivierung von NFκB konnte jedoch in der sensitiven und in nur einer der resistenten Zelllinie festgestellt werden. Interessanterweise zeigen die Expressionsanalysen, dass hier NEMO im Zytoplasma nach Behandlung verringert exprimiert war. Dies lässt eine NEMO-unabhängige NFκB Aktivierung in diesen Zelllinien vermuten, die möglicherweise auf einen alternativen NFκB-Signalweg beruhen.

Besonders interessante Aspekte liefern die Analysen zur funktionellen Bedeutung der Caspase-2, die bislang kontrovers in der Literatur diskutiert wird. Zum einen konnte gezeigt werden, dass der Caspase-2 eine Beteiligung am G2/M-Checkpoint vermitteltem Zellzyklusarrest zukommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung insbesondere der Effektorcaspase-3, aber auch der Initiatorcaspasen-8 und -9 in den Caspase-2 knockdown Nierenzellkarzinomzelllinien deutlich erhöht ist, was die Caspase-2 als rein proapoptotischen Kandidat in Frage stellt. Dieses Ergebnis zeigt somit, dass die Caspase-2 in den hier untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien nicht alleine proapoptotisch zu wirken scheint. Da in Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass die Caspase-2 eine der ersten aktivierten Caspasen im humanen Nierenzellkarzinom nach Apoptose Induktion ist, könnte sich im Hinblick auf die hier angedeutete antiapoptotische Funktion durchaus eine Beteiligung am Resistenzmechanismus des humanen RCC's präsentieren, die zur Entwicklung neuer Therapien in Zukunft beitragen könnte.

References

- Ando, K., Kernan, J.L., Liu, P.H., Sanda, T., Logette, E., Tschopp, J., Look, A.T., Wang, J., Bouchier-Hayes, L., & Sidi, S. 2012. PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling. *Mol.Cell*, 47, (5) 681-693 available from: PM:22854598
- Anguiano-Hernandez, Y.M., Chartier, A., & Huerta, S. 2007. Smac/DIABLO and colon cancer. *Anticancer Agents Med.Chem.*, 7, (4) 467-473 available from: PM:17630921
- Arai, E. & Kanai, Y. 2010. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int.J.Clin.Exp.Pathol.*, 4, (1) 58-73 available from: PM:21228928
- Ashhab, Y., Alian, A., Polliack, A., Panet, A., & Ben, Y.D. 2001. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett.*, 495, (1-2) 56-60 available from: PM:11322947
- Ashkenazi, A. 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, (3-4) 325-331 available from: PM:18495520
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, (5381) 1305-1308 available from: PM:9721089
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z., & Schwall, R.H. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J.Clin.Invest*, 104, (2) 155-162 available from: PM:10411544
- Baldino, F., Jr., Chesselet, M.F., and Lewis, M.E. (1989). High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol.* 168, 761-777.
- Baliga, B.C., Colussi, P.A., Read, S.H., Dias, M.M., Jans, D.A., & Kumar, S. 2003. Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. *J.Biol.Chem.*, 278, (7) 4899-4905 available from: PM:12477715
- Baliga, B.C., Read, S.H., & Kumar, S. 2004. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death.Differ.*, 11, (11) 1234-1241 available from: PM:15297885
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A.M., & Prives, C. 2008. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105, (6) 1937-1942 available from: PM:18238895
- Barry, M.A., Behnke, C.A., & Eastman, A. 1990a. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem.Pharmacol.*, 40, (10) 2353-2362 available from: PM:2244936
- Berube, C., Boucher, L.M., Ma, W., Wakeham, A., Salmena, L., Hakem, R., Yeh, W.C., Mak, T.W., & Benchimol, S. 2005. Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on

the death adapter protein RAIDD. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102, (40) 14314-14320 available from: PM:16183742

Blackwell, K., Zhang, L., Workman, L.M., Ting, A.T., Iwai, K., & Habelhah, H. 2013. Two coordinated mechanisms underlie tumor necrosis factor alpha-induced immediate and delayed I κ B kinase activation. *Mol.Cell Biol.*, 33, (10) 1901-1915 available from: PM:23459942

Boatright, K.M. & Salvesen, G.S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 15, (6) 725-731 available from: PM:14644197

Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D.R., & Newmeyer, D.D. 2006. Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol.Biol.Cell*, 17, (5) 2150-2157 available from: PM:16495337

Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G.P., Connell, S., Tait, S.W., Dillon, C.P., Flanagan, J.M., Beere, H.M., & Green, D.R. 2009. Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. *Mol.Cell*, 35, (6) 830-840 available from: PM:19782032

Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.G., & Liu, Z.G. 2014. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat.Cell Biol.*, 16, (1) 55-65 available from: PM:24316671

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., & Chan, F.K. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137, (6) 1112-1123 available from: PM:19524513

Cho, Y.S. & Park, S.Y. 2014. Harnessing of Programmed Necrosis for Fighting against Cancers. *Biomol.Ther.(Seoul.)*, 22, (3) 167-175 available from: PM:25009696

Chu, H.X., Zhu, J.F., Huang, J.J., Jiang, Z.Y., Lu, M.C., Zhang, X.J., Sun, H.P., & You, Q.D. 2014. Insights into targeting NEMO for pharmacological regulation. *Curr.Drug Targets.*, 15, (9) 874-887 available from: PM:25090986

Columbano, A. 1995. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J.Cell Biochem.*, 58, (2) 181-190 available from: PM:7673326

Colussi, P.A., Harvey, N.L., & Kumar, S. 1998. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J.Biol.Chem.*, 273, (38) 24535-24542 available from: PM:9733748

Combe, P., de, G.E., Thibault, C., Granier, C., Tartour, E., & Oudard, S. 2015. Trial Watch: Therapeutic vaccines in metastatic renal cell carcinoma. *Oncoimmunology.*, 4, (5) e1001236 available from: PM:26155388

Crumley, S.M., Divatia, M., Truong, L., Shen, S., Ayala, A.G., & Ro, J.Y. 2013. Renal cell carcinoma: Evolving and emerging subtypes. *World J.Clin.Cases.*, 1, (9) 262-275 available from: PM:24364021

Cuenin, S., Tinel, A., Janssens, S., & Tschopp, J. 2008. p53-induced protein with a death domain (PIDD) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and caspase-2 in response to genotoxic stress. *Oncogene*, 27, (3) 387-396 available from: PM:17637755

- de Vivar Chevez, A.R., Finke, J., & Bukowski, R. 2014. The role of inflammation in kidney cancer. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 816, 197-234 available from: PM:24818725
- Degtarev, A., Boyce, M., & Yuan, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22, (53) 8543-8567 available from: PM:14634618
- Degtarev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., & Yuan, J. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat.Chem.Biol.*, 4, (5) 313-321 available from: PM:18408713
- Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., & Yuan, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat.Chem.Biol.*, 1, (2) 112-119 available from: PM:16408008
- Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13, (3) 239-252 available from: PM:9990849
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., & Reed, J.C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388, (6639) 300-304 available from: PM:9230442
- Dorstyn, L., Puccini, J., Wilson, C.H., Shalini, S., Nicola, M., Moore, S., & Kumar, S. 2012. Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death.Differ.*, 19, (8) 1288-1298 available from: PM:22498700
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, (1) 33-42 available from: PM:10929711
- Duh, E.J., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S., & Rabson, A.B. 1989. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 86, (15) 5974-5978 available from: PM:2762307
- Endres L., Fasullo M., Rose R. 2019. tRNA modification and cancer: potential for therapeutic prevention and intervention. *Future Med Chem.* 2019 Apr;11(8):885-900. doi: 10.4155/fmc-2018-0404. Epub 2019 Feb 12.
- Ekert, P.G., Silke, J., Hawkins, C.J., Verhagen, A.M., & Vaux, D.L. 2001. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J.Cell Biol.*, 152, (3) 483-490 available from: PM:11157976
- Fadeel, B., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. 1999. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 266, (3) 699-717 available from: PM:10603308
- Fesik, S.W. 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, 103, (2) 273-282 available from: PM:11057900
- Fojo, A.T., Shen, D.W., Mickley, L.A., Pastan, I., & Gottesman, M.M. 1987. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J.Clin.Oncol.*, 5, (12) 1922-1927 available from: PM:3681376

- Gao, Z., Shao, Y., & Jiang, X. 2005. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 280, (46) 38271-38275 available from: PM:16172118
- Gilmore, T.D. 1990. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell*, 62, (5) 841-843 available from: PM:2203533
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, (51) 6680-6684 available from: PM:17072321
- GLUCKSMANN, A. 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.*, 26, (1) 59-86 available from: PM:24540363
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., & Lavrik, I.N. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 280, (15) 14507-14513 available from: PM:15701649
- Gross, A., McDonnell, J.M., & Korsmeyer, S.J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13, (15) 1899-1911 available from: PM:10444588
- Gu, Y., Sarnecki, C., Aldape, R.A., Livingston, D.J., & Su, M.S. 1995. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J.Biol.Chem.*, 270, (32) 18715-18718 available from: PM:7642516
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E.S. 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 277, (16) 13430-13437 available from: PM:11832478
- Gupta, S.C., Sundaram, C., Reuter, S., & Aggarwal, B.B. 2010. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim.Biophys.Acta*, 1799, (10-12) 775-787 available from: PM:20493977
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*, 144, 646-674 available from: PM: 21376230
- Hartmann, J.T. & Bokemeyer, C. 1999. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 19, (2C) 1541-1543 available from: PM:10365141
- Hayden, M.S. & Ghosh, S. 2014. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin.Immunol.*, 26, (3) 253-266 available from: PM:24958609
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 137, (6) 1100-1111 available from: PM:19524512
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115, (1) 1-20 available from: PM:15819693
- Heikaus, S., Pejini, I., Gabbert, H.E., Ramp, U., & Mahotka, C. 2010. PIDDosome expression and the role of caspase-2 activation for chemotherapy-induced apoptosis in RCCs. *Cell Oncol.*, 32, (1-2) 29-42 available from: PM:20208132

- Hickman, J.A. 1992. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, 11, (2) 121-139 available from: PM:1327566
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., & Yuan, J. 2008. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, 135, (7) 1311-1323 available from: PM:19109899
- Ho, L.H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P., & Kumar, S. 2009. A tumor suppressor function for caspase-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 106, (13) 5336-5341 available from: PM:19279217
- Hofmann, K., Bucher, P., & Tschopp, J. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem.Sci.*, 22, (5) 155-156 available from: PM:9175472
- Hofmann, W.K., de, V.S., Tsukasaki, K., Wachsman, W., Pinkus, G.S., Said, J.W., & Koeffler, H.P. 2001. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*, 98, (3) 787-794 available from: PM:11468180
- Huang, L., Han, D., Yang, X., Qin, B., Ji, G., & Yu, L. 2011. PIDD4, a novel PIDD isoform without the LRR domain, can independently induce cell apoptosis in cytoplasm. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 407, (1) 86-91 available from: PM:21371439
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Seufzer, B.J., Shumway, S.D., Kurama, T., Boothman, D.A., & Miyamoto, S. 2000. NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J.Biol.Chem.*, 275, (13) 9501-9509 available from: PM:10734098
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H., & Miyamoto, S. 2003. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*, 115, (5) 565-576 available from: PM:14651848
- Hur, G.M., Lewis, J., Yang, Q., Lin, Y., Nakano, H., Nedospasov, S., & Liu, Z.G. 2003. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation. *Genes Dev.*, 17, (7) 873-882 available from: PM:12654725
- Imre, G., Heering, J., Takeda, A.N., Husmann, M., Thiede, B., zu Heringdorf, D.M., Green, D.R., van der Goot, F.G., Sinha, B., Dotsch, V., & Rajalingam, K. 2012. Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis. *EMBO J.*, 31, (11) 2615-2628 available from: PM:22531785
- Jang, T.H. & Park, H.H. 2013. PIDD mediates and stabilizes the interaction between RAIDD and caspase-2 for the PIDDosome assembly. *BMB.Rep.*, 46, (9) 471-476 available from: PM:24064063
- Janssens, S. & Tinel, A. 2012. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell Death.Differ.*, 19, (1) 13-20 available from: PM:22095286
- Janssens, S., Tinel, A., Lippens, S., & Tschopp, J. 2005. PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell*, 123, (6) 1079-1092 available from: PM:16360037
- Johansson, B., Mertens, F., & Mitelman, F. 1993. Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes.Cancer*, 8, (4) 205-218 available from: PM:7512363

- Joosten, S.C., Hamming, L., Soetekouw, P.M., Aarts, M.J., Veeck, J., van, E.M., & Tjan-Heijnen, V.C. 2015. Resistance to sunitinib in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive markers and future perspectives. *Biochim.Biophys.Acta*, 1855, (1) 1-16 available from: PM:25446042
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D.V. 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.*, 38, (2) 209-223 available from: PM:23438821
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., & Leder, P. 1998. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.*, 8, (3) 297-303 available from: PM:9529147
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, 26, (4) 239-257 available from: PM:4561027
- Kim, I.R., Murakami, K., Chen, N.J., Saibil, S.D., Matysiak-Zablocki, E., Elford, A.R., Bonnard, M., Benchimol, S., Jurisicova, A., Yeh, W.C., & Ohashi, P.S. 2009. DNA damage- and stress-induced apoptosis occurs independently of PIDD. *Apoptosis.*, 14, (9) 1039-1049 available from: PM:19575295
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., & Peter, M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, 14, (22) 5579-5588 available from: PM:8521815
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., & Ashkenazi, A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.*, 12, (6) 611-620 available from: PM:10894161
- Klatte, T., Pantuck, A.J., Said, J.W., Seligson, D.B., Rao, N.P., LaRochelle, J.C., Shuch, B., Zisman, A., Kabbinavar, F.F., & Belldegrun, A.S. 2009. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.*, 15, (4) 1162-1169 available from: PM:19228721
- Knudson, A.G. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, (23) 10914-10921 available from: PM:7902574
- Kondo, K., Yao, M., Yoshida, M., Kishida, T., Shuin, T., Miura, T., Moriyama, M., Kobayashi, K., Sakai, N., Kaneko, S., Kawakami, S., Baba, M., Nakaigawa, N., Nagashima, Y., Nakatani, Y., & Hosaka, M. 2002. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes.Cancer*, 34, (1) 58-68 available from: PM:11921283
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. 1994. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev.*, 8, (14) 1613-1626 available from: PM:7958843
- Kumar, S., White, D.L., Takai, S., Turczynowicz, S., Juttner, C.A., & Hughes, T.P. 1995. Apoptosis regulatory gene NEDD2 maps to human chromosome segment 7q34-35, a region frequently affected in haematological neoplasms. *Hum.Genet.*, 95, (6) 641-644 available from: PM:7789948
- Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, (6381) 15-16 available from: PM:1614522

- Lassus, P., Opitz-Araya, X., & Lazebnik, Y. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*, 297, (5585) 1352-1354 available from: PM:12193789
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kühnle, S., & Nicotera, P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J.Exp.Med.*, 185, (8) 1481-1486 available from: PM:9126928
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., & Liu, Z.G. 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 13, (19) 2514-2526 available from: PM:10521396
- Lin, Y., Ma, W., & Benchimol, S. 2000. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat.Genet.*, 26, (1) 122-127 available from: PM:10973264
- Lin, Q., Liu, Y., Moore, D.J., Elizer, S.K., Veach, R.A., Hawiger, J., & Ruley, H.E. 2012. Cutting edge: the "death" adaptor CRADD/RAIDD targets BCL10 and suppresses agonist-induced cytokine expression in T lymphocytes. *J.Immunol.*, 188, (6) 2493-2497 available from: PM:22323537
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, (1) 147-157 available from: PM:8689682
- Logette, E., Schuepbach-Mallepell, S., Eckert, M.J., Leo, X.H., Jaccard, B., Manzl, C., Tardivel, A., Villunger, A., Quadroni, M., Gaide, O., & Tschopp, J. 2011. PIDD orchestrates translesion DNA synthesis in response to UV irradiation. *Cell Death.Differ.*, 18, (6) 1036-1045 available from: PM:21415862
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., & Housman, D.E. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74, (6) 957-967 available from: PM:8402885
- MacKenzie, S.H. & Clark, A.C. 2012. Death by caspase dimerization. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 747, 55-73 available from: PM:22949111
- Manzl, C., Krumschnabel, G., Bock, F., Sohm, B., Labi, V., Baumgartner, F., Logette, E., Tschopp, J., & Villunger, A. 2009. Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *J.Cell Biol.*, 185, (2) 291-303 available from: PM:19364921
- Manzl, C., Peintner, L., Krumschnabel, G., Bock, F., Labi, V., Drach, M., Newbold, A., Johnstone, R., & Villunger, A. 2012. PIDDosome-independent tumor suppression by Caspase-2. *Cell Death.Differ.*, 19, (10) 1722-1732 available from: PM:22595758
- Mhaidat, N.M., Wang, Y., Kiejda, K.A., Zhang, X.D., & Hersey, P. 2007. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. *Mol.Cancer Ther.*, 6, (2) 752-761 available from: PM:17308071
- Miles M. A., Kitevska-Ilioski T., Hawkins C.J., Old and Novel Functions of Caspase-2 *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;332:155-212 available from PMID: 28526132
- Miyamoto, S. 2011. Nuclear initiated NF-kappaB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res.*, 21, (1) 116-130 available from: PM:21187855

- Moquin, D.M., McQuade, T., & Chan, F.K. 2013. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis. *PLoS.One.*, 8, (10) e76841 available from: PM:24098568
- Mrozek, K. 2008. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin.Oncol.*, 35, (4) 365-377 available from: PM:18692687
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273
- Natoli, G. 2012. NF-kappaB and chromatin: ten years on the path from basic mechanisms to candidate drugs. *Immunol.Rev.*, 246, (1) 183-192 available from: PM:22435555
- Nicholson, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death.Differ.*, 6, (11) 1028-1042 available from: PM:10578171
- O'Brien, M., Eckardt, J., & Ramlau, R. 2007. Recent advances with topotecan in the treatment of lung cancer. *Oncologist.*, 12, (10) 1194-1204 available from: PM:17962613
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*, 1, (4) a000034 available from: PM:20066092
- Okada, M., Adachi, S., Imai, T., Watanabe, K., Toyokuni, S.Y., Ueno, M., Zervos, A.S., Kroemer, G., & Nakahata, T. 2004. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood*, 103, (6) 2299-2307 available from: PM:14645012
- Oliver, T.G., Mercer, K.L., Sayles, L.C., Burke, J.R., Mendus, D., Lovejoy, K.S., Cheng, M.H., Subramanian, A., Mu, D., Powers, S., Crowley, D., Bronson, R.T., Whittaker, C.A., Bhutkar, A., Lippard, S.J., Golub, T., Thomale, J., Jacks, T., & Sweet-Cordero, E.A. 2010. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev.*, 24, (8) 837-852 available from: PM:20395368
- Oliver, T.G., Meylan, E., Chang, G.P., Xue, W., Burke, J.R., Humpton, T.J., Hubbard, D., Bhutkar, A., & Jacks, T. 2011. Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Mol.Cell*, 43, (1) 57-71 available from: PM:21726810
- Osborn, L., Kunkel, S., & Nabel, G.J. 1989. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 86, (7) 2336-2340 available from: PM:2494664
- Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18, (49) 6853-6866 available from: PM:10602461
- Pan, Y., Wen, S., Tian, J., Lyu, Z., Du, Z., & Yan, L. 2015. [Imatinib is effective in a 12-month-old boy with chronic myelogenous leukemia: case report and literature review]. *Zhonghua Er.Ke.Za Zhi.*, 53, (3) 194-197 available from: PM:26165016

- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., & Brancolini, C. 2001. Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *J.Biol.Chem.*, 276, (24) 21907-21915 available from: PM:11399776
- Peintner, L., Dorstyn, L., Kumar, S., Aneichyk, T., Villunger, A., & Manzl, C. 2015. The tumor-modulatory effects of Caspase-2 and Pidd1 do not require the scaffold protein Raidd. *Cell Death.Differ.*, 22, (11) 1803-1811 available from: PM:25857265
- Pick, R., Badura, S., Bosser, S., & Zornig, M. 2006. Upon intracellular processing, the C-terminal death domain-containing fragment of the p53-inducible PIDD/LRDD protein translocates to the nucleoli and interacts with nucleolin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 349, (4) 1329-1338 available from: PM:16982033
- Polley, S., Huang, D.B., Hauenstein, A.V., Fusco, A.J., Zhong, X., Vu, D., Schrefelbauer, B., Kim, Y., Hoffmann, A., Verma, I.M., Ghosh, G., & Huxford, T. 2013. A structural basis for I κ B kinase 2 activation via oligomerization-dependent trans auto-phosphorylation. *PLoS.Biol.*, 11, (6) e1001581 available from: PM:23776406
- Puccini, J., Dorstyn, L., & Kumar, S. 2013. Caspase-2 as a tumour suppressor. *Cell Death.Differ.*, 20, (9) 1133-1139 available from: PM:23811850
- Qiao, H., Liu, Y., Veach, R.A., Wylezinski, L., & Hawiger, J. 2014. The adaptor CRADD/RAIDD controls activation of endothelial cells by proinflammatory stimuli. *J.Biol.Chem.*, 289, (32) 21973-21983 available from: PM:24958727
- Read, S.H., Baliga, B.C., Ekert, P.G., Vaux, D.L., & Kumar, S. 2002. A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J.Cell Biol.*, 159, (5) 739-745 available from: PM:12460989
- Robertson, J.D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 277, (33) 29803-29809 available from: PM:12065594
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., & Reed, J.C. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 16, (23) 6914-6925 available from: PM:9384571
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., and Arnheim,N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Samali, A., Gorman, A.M., & Cotter, T.G. 1996. Apoptosis -- the story so far... *Experientia*, 52, (10-11) 933-941 available from: PM:8917723
- Samraj, A.K., Sohn, D., Schulze-Osthoff, K., & Schmitz, I. 2007. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol.Biol.Cell*, 18, (1) 84-93 available from: PM:17079734
- Saraste, A. & Pulkki, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc.Res.*, 45, (3) 528-537 available from: PM:10728374

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., & Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 17, (6) 1675-1687 available from: PM:9501089
- Schwerdtle, R.F., Storkel, S., Neuhaus, C., Brauch, H., Weidt, E., Brenner, W., Hohenfellner, R., Huber, C., & Decker, H.J. 1996. Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 56, (13) 2927-2930 available from: PM:8674042
- Shi, M., Vivian, C.J., Lee, K.J., Ge, C., Morotomi-Yano, K., Manzl, C., Bock, F., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Zhu, R., Haug, J.S., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Chen, D.J., Chen, B.P., Villunger, A., Florens, L., & Du, C. 2009. DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance. *Cell*, 136, (3) 508-520 available from: PM:19203584
- Shi, W., Huan, W., Chen, Y., Zhang, S., Gu, X., Fan, H., Xu, J., Chen, Y., Ni, R., Lu, C., Zhang, X., Low expression of PIDD is associated with cell proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma Tumor Biology volume 37, pages10447–10457(2016) available from : PM: 26846109
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., & Kim, K. 2005. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.*, 24, (20) 3532-3542 available from: PM:16193064
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., & Martin, S.J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J.Cell Biol.*, 144, (2) 281-292 available from: PM:9922454
- Soussi, T. 2000. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 910, 121-137 available from: PM:10911910
- Speicher, M.R., Schoell, B., du, M.S., Schrock, E., Ried, T., Cremer, T., Storkel, S., Kovacs, A., & Kovacs, G. 1994. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol.*, 145, (2) 356-364 available from: PM:7519827
- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., & Alnemri, E.S. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410, (6824) 112-116 available from: PM:11242052
- Steffens, S., Janssen, M., Roos, F.C., Becker, F., Schumacher, S., Seidel, C., Wegener, G., Thuroff, J.W., Hofmann, R., Stockle, M., Siemer, S., Schrader, M., Hartmann, A., Kuczyk, M.A., Junker, K., & Schrader, A.J. 2012. Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma--a multicentre study. *Eur.J.Cancer*, 48, (15) 2347-2352 available from: PM:22698386
- Storkel, S. 1999. [Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]. *Urologe A*, 38, (5) 425-432 available from: PM:10501700

- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148, (1-2) 213-227 available from: PM:22265413
- Sun, L. & Wang, X. 2014. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. *Trends Biochem.Sci.*, 39, (12) 587-593 available from: PM:25455759
- Sun, S.C. 2011. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res.*, 21, (1) 71-85 available from: PM:21173796
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M., & Kroemer, G. 1999a. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J.Exp.Med.*, 189, (2) 381-394 available from: PM:9892620
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., & Kroemer, G. 1999b. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, (6718) 441-446 available from: PM:9989411
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., & Takahashi, R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell*, 8, (3) 613-621 available from: PM:11583623
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., & Goeddel, D.V. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, (5) 845-853 available from: PM:8397073
- Telliez, J.B., Bean, K.M., & Lin, L.L. 2000. LRDD, a novel leucine rich repeat and death domain containing protein. *Biochim.Biophys.Acta*, 1478, (2) 280-288 available from: PM:10825539
- Thoenes, W., Storkel, S., & Rumpelt, H.J. 1986. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol.Res.Pract.*, 181, (2) 125-143 available from: PM:3737468
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, (5381) 1312-1316 available from: PM:9721091
- Tinel, A., Eckert, M.J., Logette, E., Lippens, S., Janssens, S., Jaccard, B., Quadroni, M., & Tschopp, J. 2011. Regulation of PIDD auto-proteolysis and activity by the molecular chaperone Hsp90. *Cell Death.Differ.*, 18, (3) 506-515 available from: PM:20966961
- Tinel, A., Janssens, S., Lippens, S., Cuenin, S., Logette, E., Jaccard, B., Quadroni, M., & Tschopp, J. 2007. Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *EMBO J.*, 26, (1) 197-208 available from: PM:17159900
- Tinel, A. & Tschopp, J. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, 304, (5672) 843-846 available from: PM:15073321
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X., & Seed, B. 1996. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.*, 15, (22) 6189-6196 available from: PM:8947041

- Tu, S., McStay, G.P., Boucher, L.M., Mak, T., Beere, H.M., & Green, D.R. 2006. In situ trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 8, (1) 72-77 available from: PM:16362053
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. 2006. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene*, 25, (41) 5683-5692 available from: PM:16652156
- van Raam, B.J. & Salvesen, G.S. 2010. Transferring death: a role for tRNA in apoptosis regulation. *Mol.Cell*, 37, (5) 591-592 available from: PM:20227362
- Vanlangenakker, N., Bertrand, M.J., Bogaert, P., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. 2011. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death.Dis.*, 2, e230 available from: PM:22089168
- Verhelst, K., Verstrepen, L., Carpentier, I., & Beyaert, R. 2013. IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochem.Pharmacol.*, 85, (7) 873-880 available from: PM:23333767
- Villalba, M., Bockaert, J., & Journot, L. 1997. Concomitant induction of apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells following serum and potassium withdrawal. *Neuroreport*, 8, (4) 981-985 available from: PM:9141076
- Vucic, D., Stennicke, H.R., Pisabarro, M.T., Salvesen, G.S., & Dixit, V.M. 2000. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr.Biol.*, 10, (21) 1359-1366 available from: PM:11084335
- Wallace-Brodeur, R.R. & Lowe, S.W. 1999. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol.Life Sci.*, 55, (1) 64-75 available from: PM:10065152
- Wang, Z. & Sun, Y. 2010. Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl.Oncol.*, 3, (1) 1-12 available from: PM:20165689
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V., & Dixit, V.M. 2004. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430, (7000) 694-699 available from: PM:15258597
- Williams, G.T., Smith, C.A., McCarthy, N.J., & Grimes, E.A. 1992. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol.*, 2, (9) 263-267 available from: PM:14731518
- Xiao, G., Harhaj, E.W., & Sun, S.C. 2001. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol.Cell*, 7, (2) 401-409 available from: PM:11239468
- Yamazaki, K., Sakamoto, M., Ohta, T., Kanai, Y., Ohki, M., & Hirohashi, S. 2003. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*, 22, (6) 847-852 available from: PM:12584564
- Yang, Q.H. & Du, C. 2004. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J.Biol.Chem.*, 279, (17) 16963-16970 available from: PM:14960576

- Yang, C., Hornicek, F.J., Wood, K.B., Schwab, J.H., Mankin, H., & Duan, Z. 2009. RAIDD expression is impaired in multidrug resistant osteosarcoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 64, (3) 607-614 available from: PM:19125251
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., & Horvitz, H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75, (4) 641-652 available from: PM:8242740
- Alexey V Zamaraev, Gelina S Kopeina, Jörn H Buchbinder, Boris Zhivotovsky, Inna N Lavrik. Caspase-2 Is a Negative Regulator of Necroptosis. *Biochem Cell Biol.* 2018 Sep;102:101-108. doi: 10.1016/j.biocel.2018.07.006. Epub 2018 Jul 17 available from: PMID: 30025878
- Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., & Wallach, D. 2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity.*, 12, (3) 301-311 available from: PM:10755617
- Zhang, Y., Padalecki, S.S., Chaudhuri, A.R., De, W.E., Goins, B.A., Grubbs, B., Ikeno, Y., Richardson, A., Mundy, G.R., & Herman, B. 2007. Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. *Mech. Ageing Dev.*, 128, (2) 213-221 available from: PM:17188333
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O.T., & Doskeland, S.O. 1998. Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature*, 391, (6666) 449-450 available from: PM:9461210
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., & Orrenius, S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death. Differ.*, 6, (7) 644-651 available from: PM:10453075
- Zhou, W. & Yuan, J. 2014. Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 35, 14-23 available from: PM:25087983
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. 1999. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, 274, (17) 11549-11556 available from: PM:10206961

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Kennzeichen von Krebs	6
Abb.2: Darstellung der morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose.....	8
Abb.3: TNF-Rezeptor 1 vermittelte Signalwege: NFκB, Apoptose und Nekroptose.....	14
Abb.4: Der klassische NFκB-Signalweg.....	18
Abb.5: Der alternative NFκB-Signalweg.....	19
Abb.6: Schematische Darstellung der Primerlage für die Differenzierung der PIDD Isoformen.....	48
Abb.7: Western Blot Analysen zur Apoptose Detektion mittels PARP-Spaltprodukt.....	56
Abb.8: Rel. Caspase-3 Aktivierung im Nierenzellkarzinom nach Apoptoseinduktion (FCM).....	57
Abb.9: Rel. Caspase-2, -8 und -9 Aktivierung im Nierenzellkarzinom nach Apoptoseinduktion (FCM).....	58
Abb.10: Caspase-3 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	59
Abb.11: Caspase-8 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	60
Abb.12: Caspase-9 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	61
Abb.13: Fraktionierte Caspase-2 Expression im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	62
Abb.14: Fraktionierte Expression von PIDD im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	65
Abb.15: Fraktionierte Expression von RAIDD im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	67
Abb.16: Fraktionierte Expression von NEMO im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	69
Abb.17: Fraktionierte Expression von RIP1 im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	71
Abb.18: Fraktionierte Expression von DNA-PKcs im Nierenzellkarzinom nach Gabe von Zytostatika (WB).....	73
Abb.19: NFκB-Aktivierung nach Behandlung mit Zytostatika im Nierenzellkarzinom (WB).....	75
Abb.20A)-C): mRNA Expression der PIDD Isoformen 1-4 in Nierenzellkarzinomzelllinien (qRT-CR).....	77
Abb.21: mRNA Expression der PIDD Isoformen 1-4 im humanen Nierengewebe (qRT-PCR).....	80
Abb.22: Caspase-2 knockdown in clearCa-6 Zellen.....	81
Abb.23: Die Rolle der Caspase-2 in der Caspasen-Aktivierung im Nierenzellkarzinom (FCM).....	82
Abb.24: Die Rolle der Caspase-2 am G2/M-vermitteltem Zellzyklusarrest (FCM).....	84
Abb.25: Schematische Darstellung der Expression der PIDDosomen Mitglieder im humanen Nierenzellkarzinom.....	93

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: NFκB Targetgene.....	13
Tab.2: Verwendete Oligonukleotide.....	31
Tab.3: Verwendete Primärantikörper.....	31
Tab.4: Verwendete Sekundärantikörper.....	32
Tab.5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.....	47

9.3 Abkürzungen

%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AIDS	autoimmune deficiency syndrome
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotic peptidase activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	ataxia telangeictasia mutated
BAFF	B-cell activating factor
BAK	BCL2-antagonist/killer
BAX	BCL2-associated X protein
Bcl	B-cell lymphoma
Bid	BH3 interacting domain death agonist
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine
C	Cytosin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
cDNA	complementary DNA
CED-3	Cell death protein 3 subunit 1
c-FLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
cm ²	Quadratzenimeter
c-Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
cPARP	cleaved Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
CYLD	cylindromatosis (turban tumor syndrome)
DD	death domain
DED	death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP	desoxynukleosidtriphosphate

DR	death receptor
dT	desoxythymidine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
FADD	Fas-associated death domain
FCM	Flow cytometry
FCS	foetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fwd	forward
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
h	hour (Stunde)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMW	high molecular weight
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
ICE	Interleukin-1-converting enzyme
IκB	Inhibitor of kappa B
k.d.	knockdown
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
LMW	low molecular weight
LOH	Loss of heterozygosity
LTR	long terminal repeats
MAP3	mitogen-associated protein 3
mdr	multidrug resistance
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
ML-IAP	melanoma inhibitor of apoptosis
MLKL	mixed lineage kinase domain-like
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
mut	mutiert
NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHEJ	Non-homologous end joining
NIK	NFκB inducing kinase

NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Omi/HtrA2	Omi/HtrA serine peptidase 2
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Phenylalanin
PI	Propidiumiodid
PIDD	p53-inducible protein with a death domain
pmol	Picomol
pT	Primärtumor
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
qRT-PCR/qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RAIDD	Receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH-1/CED homologous protein
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
RB	Retinoblastomaprotein
RCC	renal cell carcinoma
Rel	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
rev	reverse
RHD	Rel-Homologie Domäne
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RIP3	Receptor-interacting protein 1
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SMAC/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein
Std.	Stunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
tBid	trunkiertes Bid
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transforming growth factor β
TLR	Toll-like receptor
Tm	Schmelztemperatur
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TNF- α	tumor necrosis factor α

TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
tRNA	transfer RNA
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u	Unit
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
WB	Western Blot
Wt	wildtypisch
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Ich danke allen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Für die Bereitstellung des sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. E. Gabbert.

Einen großen Dank an Herrn PD Dr. Mahotka für die Übernahme des Erstgutachtens, die sehr gute Betreuung und die zahlreichen Diskussionen und Denkanstöße.

Frau Prof. Dr. rer. nat. H. Heise danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft sowie die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Herrn Dr. med. S. Heikus für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas dieser Arbeit, die sehr gute Betreuung, Unterstützung sowie die stetige Diskussionsbereitschaft.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung danke ich sehr für das Stipendium, ohne welches ich meine Arbeit in diesem Umfang nicht hätte durchführen können.

Dem ehemaligen und heutigen Laborteam danke ich ganz herzlich für die einmalig schöne Atmosphäre im Laboralltag, die gemeinsame Zeit und Hilfestellungen. Insbesondere Sandra, Sarah, Ninon, Veve, Basti, Julia, Natascha und natürlich Sigrid.

Meinem Vater ganz besonderen Dank für seine Unterstützung, sein Interesse an meiner Arbeit und das Hüten meiner Kinder, ohne ihn wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit abzuschließen. Danke Papa!

All meinen Freunden für ihr Interesse, ihre Unterstützung und das Mut zureden sowie die Hilfsangebote in der Lernzeit, danke!

And a special thanks to my lovely friend Lumi for believing in me and supporting me in many ways! I am happy to have you in my life!

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den

Katja Mathonet