

Aus dem Charité Centrum 10 für
Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Klinik für Urologie, Campus Mitte
Direktor: Prof. Dr. med. Kurt Miller

Habilitationsschrift

Das Expressionsprofil von Inhibitoren der Apoptose und ihren Antagonisten im Nierenzellkarzinom: Korrelationen mit Histopathologie und Prognose

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Carsten Kempkensteffen
geboren am 07.11.1973 in Lippstadt

Eingereicht:	Oktober 2009
Dekanin:	Prof. Dr. med. Annette Grütters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. D. Jocham
2. Gutachter:	Prof. Dr. L. Bergmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Charakteristika des Nierenzellkarzinoms	1
1.2 IAPs und ihre Antagonisten	2
2. Zielstellung und methodische Grundlagen	6
3. Ergebnisse	8
3.1 Expression der Inhibitoren der Apoptose cIAP1 und cIAP2 in Nierenzellkarzinomen und ihre prognostische Relevanz.	8
Kempkensteffen C et al. <i>Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance.</i> International Journal of Cancer 2006; 120: 1081-86	
3.2 Expression des Inhibitors der Apoptose Livin in Nierenzellkarzinomen: Korrelationen mit Pathologie und Prognose	16
Kempkensteffen C et al. <i>Expression of the Apoptosis Inhibitor Livin in Renal Cell Carcinomas: Correlations with Pathology and Outcome.</i> TumorBiology 2007; 28: 132-138	
3.3 Expressionsniveaus der mitochondrialen IAP Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen und ihr prognostischer Stellenwert	24
Kempkensteffen C et al. <i>Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value.</i> Journal of Cancer Research Clinical Oncology 2008; 134: 543-50	
3.4 Genexpression und Promotormethylierung des XIAP-assoziierten Faktors 1 in Nierenzellkarzinomen: Korrelationen mit Pathologie und Prognose	34
Kempkensteffen C et al. <i>Gene expression and promotor methylation of the XIAP-associated Factor 1 in renal cell carcinomas: Correlations with pathology and outcome.</i> Cancer Letters 2007; 254: 227-35	
3.5 Verminderung der Expression des pro-apoptotischen XIAP-assoziierten Faktors 1 (XAF1) im Rahmen der Progression klarzelliger Nierenzellkarzinome	45
Kempkensteffen C et al. <i>Down-regulation of the pro-apoptotic XIAP associated factor-1 (XAF1) during progression of clear-cell renal cancer.</i> BMC Cancer 2009; 9: 1-7	

4. Diskussion	53
4.1 Expressionsprofil und prognostische Bedeutung der Inhibitoren der Apoptose cIAP1, cIAP2 und Livin im Nierenzellkarzinom	53
4.2 Expressionsprofil und prognostische Bedeutung der IAP-Antagonisten Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 und XAF1 im Nierenzellkarzinom	57
5. Limitierungen und Ausblick	63
6. Zusammenfassung	67
7. Literaturverzeichnis	69
8. Danksagungen	79
9. Eidesstattliche Erklärung	80

Abkürzungen

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIR(C)	Baculovirus IAP Repeat (Containing)
BRUCE	BIR-Containing Ubiquitin Conjugating Enzyme
CARD	Caspase Activating and Recruitment Domain
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
h-PBGD	humane Porphobilinogen-Deaminase
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IRS	Immunreaktivitätsscore
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NAIP	Neuronal Inhibitory Apoptosis Protein
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-B
Omi/HtrA2	High-temperature requirement protein A2
RING	Really Interesting New Gene
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
TMA	Tissue micro-array
Ts-IAP	Testis specific-Inhibitor of Apoptosis
WHO	World Health Organization
XAF1	XIAP-associated Factor 1
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis
VHL	Von-Hippel-Lindau

Einleitung

1.1 Charakteristika des Nierenzellkarzinoms

Nierenzellkarzinome nehmen ihren Ursprung vom Gewebe der Nierenrinde. Sie machen 2-3% aller malignen Tumoren des Erwachsenenalters und 80-85% aller malignen Nierentumoren aus [1]. Basierend auf pathologischen und genetischen Veränderungen werden nach der WHO Klassifikation von 2004 verschiedene Subtypen von Nierenzellkarzinomen unterschieden. Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit einem Anteil von 75%, vor papillären (10%) und chromophoben (5%) Nierenzellkarzinomen, der häufigste Subtyp [2]. Unter den urologischen Malignomen weisen Nierenzellkarzinome die höchste tumorspezifische Mortalität auf [3]. In Europa werden derzeit pro Jahr ca. 40.000 Neuerkrankungen und knapp 20.000 tumorbedingte Todesfälle registriert [4]. Die vollständige operative Tumorsanierung durch Nephrektomie, Nierenteilresektion oder thermische Ablationsverfahren stellen derzeit die Grundpfeiler der kurativen Therapie des klinisch lokalisierten Nierenzellkarzinoms dar [5]. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen jedoch bereits etwa ein Drittel der Betroffenen Metastasen auf [6]. Ein weiteres Drittel der Patienten, die aufgrund eines primär lokalisierten Nierenzellkarzinoms in kurativer Intention operiert werden, erleidet im Verlauf ein Rezidiv [7]. Dabei sind Lokalrezidive mit ca. 5% wesentlich seltener als das sekundäre Auftreten von Metastasen [1]. Im metastasierten Stadium beträgt das mediane Überleben betroffener Patienten nur ca. 12 Monate, die 5-Jahres Überlebensrate nicht wesentlich mehr als 10% [8]. Dies ist vor allem auf das extrem schlechte Ansprechen des Nierenzellkarzinoms auf konventionelle Chemo- oder Strahlentherapien zurückzuführen [9]. Auch mittels Interferon- α und Interleukin-2 basierter Immuntherapiekonzepte konnten in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms nur sehr moderate objektive Ansprechraten von 10-20% erreicht werden, wobei in Einzelfällen aber auch lang andauernde Vollremissionen beschrieben wurden [10]. Erst ein zunehmendes Verständnis der in Nierenzellkarzinomzellen aktiven Signaltransduktionswege führte schließlich zur Entwicklung spezifischer, insbesondere gegen die Angiogenese gerichteter Therapiestrategien [11]. Medikamente wie Sunitinib, Sorafenib, Bevacizumab und Temsirolimus wurden für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen, nachdem gezeigt werden konnte, dass sie die Prognose der Patienten

gegenüber dem bisherigen Therapiestandard Interferon- α signifikant verbessern [12]. In Anbetracht dieser neuen Therapieoptionen, bekommt die postoperative Tumornachsorge von Nierenzellkarzinompatienten einen zunehmend größeren Stellenwert. Um diese möglichst effizient zu gestalten, und um dem steigenden Informationsbedarf seitens der Patienten gerecht zu werden, bedarf es einer möglichst zuverlässigen Einschätzung des Rezidivrisikos. Die Abschätzung der Prognose ist des Weiteren zur Optimierung der Therapieplanung und insbesondere bei der Auswahl von Patienten für klinische Studien, z.B. zur adjuvanten Therapie, von herausragender Bedeutung.

Die derzeit etablierten prognostischen Parameter gliedern sich vornehmlich in anatomische (z.B. TNM-Klassifikation), histologische (z.B. Differenzierung, Subtyp, Nachweis von Nekrosen), klinische (z.B. Leistungsindex nach Karnofsky und ECOG) und laborchemische (z.B. Serum Calcium, Serum LDH, Hämoglobin) Faktoren [13]. Aus der Kombination dieser Parameter wurden, sowohl für Patienten mit lokal begrenzten als auch für solche mit metastasierten Nierenzellkarzinomen, verschiedene integrierte Modelle und Nomogramme zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs entwickelt. Einige dieser Modelle haben nach erfolgreicher Validierung bereits Eingang in die klinische Routine gefunden [14]. Trotz dieses Fortschritts repräsentieren die einzelnen Variablen solcher Modelle aber nur Surrogatparameter für die, der sehr heterogenen Aggressivität von Nierenzellkarzinomen zu Grunde liegenden, molekularen Veränderungen im Tumor [15]. Man geht deshalb davon aus, dass die Identifizierung und Inkorporation molekularer Parameter in integrierte Prognosemodelle deren Vorhersagegenauigkeit durch eine bessere Reflektion des individuellen Tumorverhaltens noch deutlich steigern wird [16]. Die Erforschung molekularer Faktoren, die potentiell eine Rolle in der Tumorbiologie des Nierenzellkarzinoms spielen, bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Mechanismen der Tumorigenese und Tumorprogression aufzuklären sowie neue therapeutische Ziele zu identifizieren [17].

1.2 IAPs und ihre Antagonisten

Eine interessante Gruppe stellen diesbezüglich Moleküle dar, die an der Regulation des programmierten Zelltodes, der Apoptose, beteiligt sind. Eine gestörte Expression solcher Faktoren kann Zellen eine gesteigerte Resistenz gegenüber der Apoptose verleihen, was wiederum bei der Entstehung, dem Fortschreiten und dem

Therapieversagen maligner Tumoren eine entscheidende Rolle spielt [18, 19]. In diesem Zusammenhang wurden beim Menschen bisher vor allem zwei große Gruppen von Apoptoseregulatoren untersucht: die Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-Proteinfamilie [20, 21] und die IAP (inhibitor of apoptosis)-Proteinfamilie [22-24]. IAPs sind eine in der Evolution hoch konservierte Gruppe von Proteinen, deren gemeinsames Strukturmerkmal das Vorhandensein mindestens einer BIR (Baculovirus IAP Repeat)-Domäne darstellt [22]. Tabelle 1 zeigt die acht derzeit bekannten Mitglieder der IAP-Familie, die entsprechend der Homologie ihrer BIR-Domänen und in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer RING (Really Interesting New Gene)-Domäne in drei Klassen eingeteilt werden [25, 26].

Tabelle 1: Mitglieder der IAP-Familie

Klasse 1 (eine - drei homologe BIR-Domänen, eine RING-Domäne):	
X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)	Synonyme: BIRC4, ILP1, MIHA, XLP2
cellular Inhibitor of Apoptosis 1 (cIAP1)*	Synonyme: BIRC2, HIAP2, MIHB
cellular Inhibitor of Apoptosis 2 (cIAP2)*	Synonyme: BIRC3, HIAP1, MIHC
Livin	Synonyme: BIRC7, ML-IAP, KIAP
Testis-specific Inhibitor of Apoptosis (Ts-IAP)	Synonyme: BIRC8, ILP2, hILP-2
Klasse 2 (drei BIR-Domänen, keine RING-Domäne):	
Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP)	Synonyme: BIRC1, NLRB
Klasse 3 (eine BIR-Domäne, keine RING-Domäne):	
Survivin	Synonyme: BIRC5
BIR-Containing Ubiquitin Conjugating Enzyme (BRUCE)	Synonyme: BIRC6, Apollon

* verfügen zusätzlich über ein CARD (Caspase Activating and Recruitment Domain)-Motif.

IAPs, allen voran XIAP, können über die Inhibierung von Initiator- und Effektor-Caspasen sowohl die extrinsische als auch in die intrinsische Apoptosekaskade hemmen. Dieser Mechanismus galt lange Zeit als Schlüsselfunktion der IAPs [27, 28]. Seine physiologische Relevanz wird jedoch in Anbetracht der Entdeckung zahlreicher weiterer IAP Regulatorfunktionen im Rahmen der Signaltransduktion, Differenzierung, Proliferation, Migration und Immunantwort zunehmend kritisch diskutiert [29, 30]. Einigkeit besteht aber dahingehend, dass die in zahlreichen Tumorzelllinien und Tumorentitäten beobachtete Überexpression von IAPs einen

effektiven Schutz vor der Apoptoseinduktion durch zahlreiche pro-apoptotische Stimuli vermittelt [24]. Entsprechend ist eine vermehrte Expression von IAPs in diversen Malignomen oftmals mit einer Progression, gesteigerter Therapieresistenz und schlechteren Prognose vergesellschaftet - eine Tatsache, die die IAPs selbst zu attraktiven therapeutischen Zielen macht [31-33].

Als Prototypen für die Entwicklung IAP-antagonistischer Therapiestrategien dienen dabei vor allem endogene Gegenspieler der IAPs wie Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI), Omi/HtrA2 (High-temperature requirement protein A2) und XAF1 (XIAP-associated factor 1) [25, 26]. Diese Proteine sind in der Lage, die Aktivität von IAPs zu antagonisieren und tragen in der normalen Zelle so zur Gewährleistung eines Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren bei. Entsprechend kann neben einer vermehrten Expression von IAPs auch eine verminderte Expression ihrer Antagonisten eine gesteigerte Apoptoseresistenz bedingen und so ebenfalls zur Entstehung, zum Fortschreiten und zum schlechten Therapieansprechen maligner Tumoren beitragen [33, 34]. Diese Erkenntnisse lassen die Untersuchung der Expression von IAPs und ihren Gegenspielern im Hinblick auf mögliche funktionelle, therapeutische und prognostische Aspekte gerade im Nierenzellkarzinom besonders attraktiv erscheinen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme unserer Forschungsaktivitäten lagen diesbezüglich jedoch erst wenige Untersuchungen vor.

Die erste Arbeit wurde im Jahre 2002 von Mahotka et al. publiziert. Die Arbeitsgruppe quantifizierte mittels Echtzeit-RT-PCR die mRNA Expression dreier Survivin Splicevarianten im Tumorgewebe von 57 Nierenzellkarzinomproben. Eine direkte Korrelation der relativen Genexpression dieser Varianten mit dem Tumorstadium (T-Stadium) oder dem Grad der Differenzierung (G-Stadium) konnte nicht nachgewiesen werden [35]. An dieser Stelle sei jedoch angemerkt, dass seit 2006 weitere Arbeiten zur Proteinexpression von Survivin im Nierenzellkarzinom veröffentlicht wurden. Alle Studien kamen zu dem Ergebnis, dass eine hohe Survivinexpression im Tumorgewebe mit einem aggressiven Tumorverhalten und sowohl in uni- als auch in multivariaten Analysen mit einer signifikant schlechteren Prognose korreliert [17, 36-38].

Ramp et al. konnten in einer immunhistochemischen Untersuchung an 145 klarzelligen Nierenzellkarzinomproben zeigen, dass eine ansteigende Expression von

XIAP signifikant mit einer Progression des T- und G-Stadiums assoziiert war. Darüber hinaus konnte XIAP als unabhängiger prognostischer Parameter identifiziert werden [39]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte wenig später auch parallel die mRNA- und Proteinexpression von XIAP und Smac/DIABLO im Nierenzellkarzinom. In dieser Studie konnte nun auch eine direkte Korrelation der mRNA Expression von XIAP, nicht aber der von Smac/DIABLO mit der Tumorprogression nachgewiesen werden [40]. Hingegen konnten Mizutani et al. in einer Arbeit an 78 korrespondierenden Tumor- und Normalgewebeproben von Nierenzellkarzinompatienten zeigen, dass die Expression von Smac/DIABLO im Tumorgewebe, verglichen mit der in den entsprechenden Normalproben, signifikant erniedrigt war. Die Stärke der Expressionsabnahme korrelierte dabei invers mit der Tumorprogression. Darüber hinaus zeigte eine univariate Überlebensanalyse, dass das Fehlen der Expression von Smac/DIABLO im Tumorgewebe mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet war [41].

2. Zielstellung und methodische Grundlagen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es das Expressionsprofil weiterer IAP-Familienmitglieder wie cIAP1, cIAP2 und Livin sowie der IAP-Antagonisten XAF1 und Omi/HtrA2 im Nierenzellkarzinom zu untersuchen. Aufbauend auf den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe in der Bewertung mRNA-basierter Biomarker im Urothelkarzinom der Harnblase, lag der Schwerpunkt unserer Studien dabei auf der Evaluation der mRNA Expression dieser Apoptoseregulatoren im Hinblick auf ihre potentielle Eignung als Marker der Tumorprogression oder Prognose von Nierenzellkarzinompatienten [42-44]. In Anbetracht der diesbezüglich zum Teil kontroversen Datenlage für Smac/DIABLO, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Expression dieses IAP-Antagonisten im Nierenzellkarzinom erneut untersucht [40, 41].

Sämtliche quantitativen mRNA Expressionsanalysen dieser Arbeit wurden mittels eines Echtzeit-RT-PCR Verfahrens auf Basis der Light-Cycler Technologie durchgeführt. Basis dieser Analytik ist die sogenannte „relative Quantifizierung“. Dabei wird die Expression des zu untersuchenden Zielgens jeweils auf die eines Referenzgens, in unserer Arbeit die humane Porphobilinogen-Deaminase (h-PBGD), normiert. Das Ergebnis ist ein dimensionsloser Quotient, der Ausdruck der relativen Expressionshöhe des entsprechenden Zielgens ist.

Das mRNA Expressionsprofil der IAP-Familienmitglieder cIAP1 und cIAP2 wurde so vergleichend an 127 Nierenzellkarzinomproben und korrespondierenden Proben von normalem Nierenparenchym bestimmt.

Die quantitative Expression von Livin wurde an 152 Tumor- und an 142 dazu gepaarten Normalproben untersucht. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung waren bereits zwei Livin Splicevarianten, Livin α und β , bekannt [45]. Um zu überprüfen, ob die im Rahmen der Echtzeit-RT-PCR ermittelten Werte der relativen Livinexpression auf die Expression nur einer oder beider Varianten zurückzuführen waren, wurde nachfolgend noch eine Splicevarianten-spezifische RT-PCR durchgeführt. Die Authentizität der entsprechenden PCR Produkte wurde durch Sequenzierung überprüft. An einer zufällig ausgewählten Stichprobe von Tumorgewebe wurde mittels Western Blot auch die Proteinexpression der Livin Splicevarianten untersucht.

Die Quantifizierung der mRNA Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 erfolgte ausschließlich am Tumorgewebe von 85 Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

Die relative Genexpression von XAF1 wurde an 91 Nierenzellkarzinomproben ermittelt. Darüber hinaus wurde nach zusätzlicher Extraktion der DNA aus 80 dieser Proben auch die Bedeutung der Promotormethylierung für die transkriptionelle Regulation des XAF1 Gens im Nierenzellkarzinom mittels quantitativer methylierungsspezifischer PCR untersucht.

In einer weiteren Arbeit wurde die Proteinexpression von XAF1 an einem TMA (Tissue micro-array) mit 291 Proben klarzelliger Nierenzellkarzinome immunhistologisch untersucht. Zusätzlich wurde die XAF1 Expression auch an 68 normalen Nierenparenchymproben, die zu den untersuchten Tumorgeweben nicht gepaart waren, bestimmt.

Die in den einzelnen Arbeiten ermittelten Expressionsprofile wurden nachfolgend mittels adäquater statistischer Tests auf mögliche Korrelationen mit klinischen und histopathologischen Parametern sowie mit der Prognose der Patienten hin überprüft.

Die Resultate unserer Studien haben Eingang in fünf Publikationen gefunden, die in den Ergebnisteil dieser Arbeit eingefügt sind. Eine detaillierte Darstellung der angewendeten Methoden sowie der Erkenntnisse zu funktionellen Eigenschaften, Mechanismen der Expressionsregulation und zur Expression der untersuchten IAPs und IAP-Antagonisten in anderen Normal- und Tumorgeweben, bitte ich den entsprechenden Veröffentlichungen zu entnehmen. Nachfolgend werden die wesentlichen Ergebnisse der einzelnen Arbeiten dargestellt. Im Anschluss erfolgt deren Diskussion und kritische Bewertung vor dem Hintergrund der aktuellen Datenlage und im Hinblick auf zukünftige Projektmöglichkeiten.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Inhibitoren der Apoptose cIAP1 und cIAP2 in Nierenzellkarzinomen und ihre prognostische Relevanz

Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Köllermann J, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance. *International Journal of Cancer* 2006; 120: 1081-86

In dieser Studie konnte auf Ebene der Transkription erstmalig eine Überexpression von cIAP1 und cIAP2 in jeweils ca. 80% der untersuchten Nierenzellkarzinomproben, verglichen mit korrespondierenden Normalproben, nachgewiesen werden. Nur etwa 20% der Probenpaare wiesen im Tumor eine niedrigere Expression dieser cIAPs auf als im Normalgewebe. Dementsprechend ergab der paarweise Vergleich der Expressionsniveaus eine signifikant höhere Expression von cIAP1 und cIAP2 im Tumorgewebe ($p < 0,001$ und $p < 0,001$). Um die Stärke der Überexpression beider cIAPs im Nierenzellkarzinom zu veranschaulichen, wurden jeweils die Quotienten der relativen Genexpression aus Tumor- und Normalgewebe, d.h. die cIAP Ratio (T/N), berechnet. Die mediane cIAP1 Ratio (T/N) lag bei 1,96 (Streubreite: 0,19 – 6389), die mediane cIAP2 Ratio (T/N) bei 4,0 (Streubreite 0,001 – 2964). Im Gegensatz zur cIAP2 Ratio (T/N) korrelierte die cIAP1 Ratio (T/N) mit dem Tumorstadium und lag für Karzinome im Stadium pT1 signifikant über der in weiter fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen ($p = 0,020$). Entsprechend hatten Patienten mit pT1 Tumoren signifikant häufiger eine cIAP1 Ratio (T/N) > 1 , als Patienten mit pT2 oder pT3 Tumoren ($p = 0,030$). Darüber hinaus bestand eine Assoziation der Expression von cIAP1 mit dem Geschlecht. Eine cIAP1 Ratio (T/N) > 1 wurde bei 91,8% der weiblichen, aber nur bei 73,1% der männlichen Patienten nachgewiesen ($p = 0,020$). In Anbetracht der inversen Korrelation der cIAP1 Ratio (T/N) mit dem T-Stadium war diese Assoziation möglicherweise dadurch bedingt, dass pT2 und pT3 Tumoren bei Männern häufiger waren (63,2%) als bei Frauen (44,7%). Korrelationen der Genexpression mit dem Patientenalter, der Tumordifferenzierung und dem histologischen Subtyp konnten weder für cIAP1 noch für cIAP2 gefunden werden. Dabei muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass in dieser Studie sowohl die Probenanzahl gut differenzierter G1-Tumoren ($n = 2$) als auch die nicht-klarzelliger Karzinome ($n = 10$) gering war. Für die Untersuchung möglicher Korrelationen der cIAP Expression mit dem rezidivfreien- und tumorspezifischen Überleben wurden die

Patienten in Gruppen mit einer cIAP Ratio (T/N) > 1 und ≤ 1 dichotomisiert. In einer multivariaten, für Alter und Geschlecht adjustierten Cox Regressionsanalyse, konnte die cIAP1 Ratio (T/N) als ein vom T- und G-Stadium unabhängiger prognostischer Parameter identifiziert werden. Das relative Risiko von Patienten mit einer cIAP1 Ratio (T/N) ≤ 1 ein Tumorrezidiv bzw. einen tumorbedingten Tod zu erleiden war, im Vergleich zu denen mit einer Ratio (T/N) > 1 , um den Faktor 3,0 bzw. 2,8 erhöht ($p=0,015$ und $p=0,016$). Entsprechend zeigten Patienten mit einer cIAP1 Ratio (T/N) ≤ 1 in der Kaplan-Meier Analyse ein signifikant kürzeres rezidivfreies und tumorspezifisches Überleben ($p=0,002$ und $p=0,002$). Für das T-Stadium stratifizierte Kaplan-Meier Schätzer zeigten darüber hinaus, dass dieser prognostische Effekt in der Gruppe von Patienten mit organüberschreitenden pT3 Tumoren besonders stark ausgeprägt war ($p<0,001$ und $p<0,001$). Für die Expression von cIAP2 konnte keine Korrelation mit der Prognose nachgewiesen werden.

3.2 Expression des Inhibitors der Apoptose Livin in Nierenzellkarzinomen: Korrelationen mit Pathologie und Prognose

Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Köllermann J, Magheli A, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Expression of the Apoptosis Inhibitor Livin in Renal Cell Carcinomas: Correlations with Pathology and Outcome. *TumorBiology* 2007; 28: 132-138

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die mRNA des IAP-Familienmitglieds Livin in 59 der 152 untersuchten Nierenzellkarzinomproben (38,8%), hingegen aber in keiner der 145 korrespondierenden Normalgewebeproben exprimiert wurde. Die mediane relative Genexpression Livin positiver Tumoren lag bei 58,1 (Streubreite: 3,0 – 1101). Diese Tumoren zeigten dabei stets eine simultane Expression der Livin Splicevarianten α und β . In Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf mRNA Ebene konnte mittels stichprobenartig durchgeführter Western Blot Analyse Livin exprimierender Nierentumorproben jeweils auch eine Translation beider Splicevarianten in die entsprechenden Proteine nachgewiesen werden. Weder in der qualitativen noch in der quantitativen Analyse zeigte sich eine Assoziation der Expression von Livin mit histopathologischen Tumorcharakteristika (histologischer Subtyp, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad) oder klinischen Parametern (Patientenalter, Geschlecht). Des Weiteren konnten zwischen Patienten mit Livin positiven und Livin negativen Nierenzellkarzinomen keine signifikanten Unterschiede im rezidivfreien und tumorspezifischen Überleben gefunden werden. Nachfolgend wurde der prognostische Stellenwert der Livin Expression in der Gruppe von Patienten mit Livin positiven Tumoren separat untersucht. Dazu erfolgte zunächst die Dichotomisierung der Patienten über die mediane relative Livinexpression in Subgruppen mit hohem und niedrigem Expressionsniveau. Die Kaplan-Meier Analyse zeigte nun einen deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Trend in Richtung eines längeren rezidivfreien Überlebens von Patienten, deren Nierenzellkarzinome eine hohe Expression von Livin aufwiesen ($p=0,07$).

3.3 Expressionsniveaus der mitochondrialen IAP Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen und ihr prognostischer Stellenwert

Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Magheli A, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* 2008; 134: 543-50

In dieser Arbeit wurde das mRNA Expressionsprofil der mitochondrialen IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen untersucht. Eine Expression von Smac/DIABLO war in allen, eine Expression von Omi/HtrA2 in 83 der 85 untersuchten Tumorgewebe nachzuweisen. Das mediane Expressionsniveau lag für Smac/DIABLO bei 15,3 (Streubreite: 2,2 – 534,4) und für Omi/HtrA2 bei 23,4 (Streubreite: 0 – 815,8), wobei das Expressionsniveau beider Gene in den Proben stark miteinander korrelierte (Pearson Korrelationskoeffizient: 0,90; $p < 0,001$). Weder die Expressionshöhe von Smac/DIABLO, noch die von Omi/HtrA2 zeigten signifikante Korrelationen mit dem Tumorstadium, der Tumordifferenzierung, dem Patientenalter oder Geschlecht. Das Expressionsniveau von Smac/DIABLO war jedoch im Gegensatz zu dem von Omi/HtrA2 stark mit dem Status der Metastasierung assoziiert ($p = 0,016$). Es fand sich ein signifikanter Trend in Richtung einer kontinuierlichen Abnahme der Smac/DIABLO Expression im Tumorgewebe von Patienten, die postoperativ keine Metastasen ($n = 65$) entwickelten, über die, bei denen eine sekundäre Metastasierung ($n = 13$) auftrat, hin zu denen, die zum Zeitpunkt der Nephrektomie bereits Metastasen ($n = 7$) aufwiesen ($p = 0,006$). Für die Untersuchung des prognostischen Stellenwertes beider Parameter wurde die Studienpopulation in Gruppen mit hoher und niedriger Expression von Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2 unterteilt. Den Grenzwert bildete jeweils das mediane Expressionsniveau. Die Kaplan-Meier Analysen zeigten ein signifikant kürzeres rezidivfreies- und tumorspezifisches Überleben ($p = 0,019$ und $p = 0,001$) von Patienten, deren Tumoren ein niedriges Expressionsniveau von Smac/DIABLO aufwiesen. Die geschätzten Raten für das rezidivfreie- und tumorspezifische 5-Jahresüberleben lagen für diese Patienten bei nur 65% und 46%, wohingegen die der Patienten mit einer hohen Smac/DIABLO Expression im Tumor bei 90% und 95% lagen. Eine entsprechend schlechtere Prognose konnte auch für Patienten mit einer niedrigen Expression von Omi/HtrA2 gezeigt werden, wenn auch in abgeschwächter

Form ($p=0,033$ und $p=0,032$). Mittels univariater Cox Regression konnten für das rezidivfreie Überleben neben Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 auch das T-Stadium und für das tumorspezifische Überleben zusätzlich das M-Stadium als prognostisch relevant identifiziert werden. Aufgrund der niedrigen Patientenzahl fanden nur die bereits univariat signifikanten Parameter Eingang in die nachfolgend durchgeführte multivariate Analyse. Außer Omi/HtrA2 konnten im multivariaten Modell alle anderen Eingangsparameter als prognostisch unabhängig identifiziert werden. Dabei war das relative Risiko von Patienten mit einer niedrigen Smac/DIABLO Expression für die Entwicklung eines Rezidivs bzw. für ein tumorbedingtes Versterben gegenüber Patienten mit einer hohen Expression um den Faktor 5,3 bzw. 4,2 erhöht ($p=0,031$ und $p=0,023$).

3.4 Genexpression und Promotormethylierung des XIAP-assoziierten Faktors 1 in Nierenzellkarzinomen: Korrelationen mit Pathologie und Prognose

Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Magheli A, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Gene expression and promotor methylation of the XIAP-associated Factor 1 in renal cell carcinomas: Correlations with pathology and outcome. *Cancer Letters* 2007; 254: 227-35

In dieser Arbeit konnte in 85 der 91 untersuchten Nierenzellkarzinomproben (93,4%) eine mRNA Expression des nukleären IAP-Antagonisten XAF1 nachgewiesen werden. Die mediane relative Genexpression von XAF1 lag bei 146,5 (Streubreite: 0 – 3286,5). In 80 dieser Proben wurde auch die Methylierung des XAF1 Promotors untersucht. Die Methylierungsfrequenz lag bei 10%, d.h. in nur 8 Tumorproben konnte eine Methylierung detektiert werden. Der Grad der Methylierung in diesen Proben schwankte dabei zwischen 10% und 88% und war invers mit der mRNA Expression von XAF1 korreliert (Spearman Korrelationskoeffizient -0,83; $p=0,01$). Weder der Methylierungsstatus noch das mRNA Expressionsniveau von XAF1 zeigten eine Assoziation mit dem histologischen Tumorsubtyp oder mit Patienteneigenschaften wie Alter und Geschlecht. Des Weiteren fanden sich keinerlei Korrelationen mit prognostischen Standardparametern wie dem T-Stadium, G-Stadium und dem Status der Metastasierung. Aufgrund der geringen Methylierungsfrequenz wurden potentielle Beziehungen zwischen dem Methylierungsstatus und der Prognose nicht untersucht. Nach Dichotomisierung der Patienten über die mediane XAF1 mRNA Expression im Tumorgewebe in Gruppen mit niedriger und hoher Expression, deutete eine durchgeführte multivariate Cox Regression für XAF1 auf einen vom T-Stadium und M-Stadium unabhängigen prognostischen Stellenwert hin. Eine niedrige Expression von XAF1 erhöhte demnach gegenüber einer hohen Expression das relative Risiko der Patienten für ein Karzinomrezidiv bzw. für einen karzinombedingten Tod um den Faktor 6,6 ($p=0,003$) bzw. 3,4 ($p=0,023$). Um diesen prognostischen Effekt weiter zu evaluieren wurden zusätzlich Kaplan-Meier Schätzer mit Stratifizierung für das T-Stadium berechnet. Diese zeigten in der Subgruppe organbegrenzter Tumoren (pT1 und pT2) ein signifikant verkürztes rezidivfreies und ein knapp nicht signifikant verkürztes tumorspezifisches Überleben von Patienten, deren Karzinome eine niedrige XAF1 Expression aufwiesen ($p=0,038$ und $p=0,085$). In der Gruppe organüberschreitender Karzinome (pT3) war dieser prognostische Effekt wesentlich stärker ausgeprägt. Für

Patienten mit einem pT3 Tumor, dessen XAF1 Expression niedrig war, betrug die geschätzte mittlere Zeit bis zum Rezidiv nur 21 Monate, die bis zum tumorassoziierten Tod nur 25 Monate. Demgegenüber zeigten Patienten mit pT3 Karzinomen, die XAF1 hoch exprimierten, eine sowohl signifikant längere rezidivfreie als auch tumorspezifische Überlebenszeit von 93 bzw. 88 Monaten ($p=0,009$ und $p=0,005$).

3.5 Verminderung der Expression des pro-apoptotischen XIAP assoziierten Faktors-1 (XAF1) im Rahmen der Progression klarzelliger Nierenzellkarzinome

Kempkensteffen C, Fritzsche FR, Johannsen M, Weikert S, Hinz S, Dietel M, Riener MO, Moch H, Jung K, Krause H, Miller K, Kristiansen G. Down-regulation of the pro-apoptotic XIAP associated factor-1 (XAF1) during progression of clear-cell renal cancer. BMC Cancer 2009; 9: 1-7

Im Rahmen dieser immunhistologischen Untersuchung konnten wir die Expression von XAF1 in 64 von 68 normalen Nierengeweben und in 267 von 291 untersuchten klarzelligem Nierenzellkarzinomgeweben nachweisen. Dabei fand sich sowohl in den Normal- als auch in den Karzinomproben ein nukleäres Expressionsmuster. Im Normalgewebe war XAF1 besonders stark im Epithel der distalen Tubuli, aber auch regelmäßig im Epithel der proximalen Tubuli sowie in Mesangiumzellen der Glomeruli exprimiert. Signifikante Unterschiede im medianen XAF1 Immunreaktivitätsscore zwischen Normal- (IRS 40; Streubreite: 0 - 180) und Tumorgewebe (IRS 50; Streubreite: 0 - 180) bestanden nicht. Für die Evaluation potentieller Korrelationen der Expression von XAF1 mit klinischen und histopathologischen Parametern sowie mit der Prognose wurden die Nierenzellkarzinompatienten anhand des medianen XAF1 Expressionsniveaus im Tumorgewebe in Gruppen mit niedriger und hoher Expression dichotomisiert. Patienten mit einer niedrigen Expression von XAF1 im Tumor wiesen signifikant häufiger organüberschreitende pT3 und pT4 Tumoren ($p=0,040$) sowie häufiger schlecht bis undifferenzierte G3 und G4 Nierenzellkarzinome ($p<0,001$) auf, als Patienten deren Tumoren eine hohe Expression von XAF1 zeigten. Assoziationen der Expression von XAF1 mit dem Metastasierungsstatus sowie mit dem Geschlecht oder dem Alter der Patienten fanden sich nicht. In der univariaten Kaplan-Meier Überlebensanalyse zeigten Patienten, deren Tumoren ein niedriges Expressionsniveau von XAF1 aufwiesen, im Vergleich zu denen mit einer hohen XAF1 Expression, ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p=0,018$). Ein unabhängiger prognostischer Effekt konnte im Rahmen der nachfolgend durchgeführten multivariaten Analyse jedoch nur für bereits etablierte Prognosefaktoren wie das T-, G- und M-Stadium, nicht aber für XAF1 nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Expressionsprofil und prognostische Bedeutung der Inhibitoren der Apoptose cIAP1, cIAP2 und Livin im Nierenzellkarzinom

Bisher konnte in zahlreichen soliden Tumoren wie Pleuramesotheliomen, Bronchial-, Ösophagus-, Pankreas-, Hepatozellulären- und Prostatakzinomen sowie in diversen hämatologischen Tumorentitäten eine verstärkte, in Zervix- und Kolonkarzinomen hingegen eine verminderte Expression von cIAPs nachgewiesen werden [34, 46-53]. Im Rahmen unserer vergleichenden mRNA Expressionsuntersuchung von cIAP1 und cIAP2 an Nierenzellkarzinom- und korrespondierenden Normalproben konnten wir in der Mehrzahl der Gewebepaare eine Überexpression beider Apoptoseinhibitoren im Tumorgewebe nachweisen. Es ist bekannt, dass Nierenzellkarzinomzelllinien, denen funktionell intaktes Von-Hippel-Lindau Protein fehlt, eine Überexpression NF- κ B induzierter anti-apoptotischer Gene, darunter auch cIAP1 und cIAP2, aufweisen [54]. Da in den meisten Nierenzellkarzinomen eine biallelische Inaktivierung des VHL-Gens vorliegt, könnte dies möglicherweise für die beobachtete Steigerung der cIAP Expression im Tumor bedeutsam sein [55]. Auch der, in einigen Nierenzellkarzinomen nachweisbaren Chromosomen-Amplifikation der 11q21-q23 Region, in der beide cIAP-Gene lokalisiert sind, könnte im Rahmen der transkriptionellen Überexpression von cIAP1 und cIAP2 eine Bedeutung zukommen [56-58].

Überraschend war das Ergebnis, dass die Überexpression von cIAP1 im Nierentumorgewebe mit frühen Tumorstadien assoziiert war und als unabhängiger Vorhersageparameter einer günstigen Prognose identifiziert werden konnte. Unter dem Aspekt der primär anti-apoptotischen Funktionen von cIAP1 und cIAP2 und in Anbetracht der Studienlage zu anderen Klasse 1 IAPs wie XIAP und Survivin im Nierenzellkarzinom, wäre hingegen eher eine Assoziation der vermehrten Expression von cIAPs mit einem aggressiven Tumorverhalten zu erwarten gewesen. Sowohl für XIAP als auch für Survivin konnten andere Arbeitsgruppen die Assoziation eines hohen Expressionsniveaus im Nierenzellkarzinom mit fortgeschrittenen T- und G-Stadien nachweisen. Darüber hinaus war eine hohe Expression dieser Parameter jeweils mit einer eingeschränkten Prognose vergesellschaftet [17, 36-39, 59]. In Ovarialkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs konnte auch eine starke Expression von cIAP1 als Vorhersageparameter einer schlechten

Prognose identifiziert werden [60, 61]. Ein direkter Vergleich dieser Studien mit unserer Arbeit ist jedoch durch methodische Unterschiede limitiert. Während wir das mRNA Expressionsniveau der cIAPs vergleichend zwischen Tumor- und Normalgewebe analysierten, wurde im Falle von Survivin, XIAP und cIAP1 jeweils die Proteinexpression isoliert im Tumorgewebe gemessen [17, 36, 38, 39, 60, 61]. Allerdings konnte die Korrelation einer hohen XIAP Expression mit der Progression von Nierenzellkarzinomen später auch auf mRNA Ebene bestätigt werden [40]. Dennoch konnten, unseren Ergebnissen entsprechend, auch andere Arbeitsgruppen Korrelationen einer gesteigerten IAP Expression mit günstigen histopathologischen Tumorcharakteristika und einer guten Prognose zeigen. So korreliert eine hohe XIAP Expression in Bronchial- und Prostatakarzinomen mit einem verlängerten tumorspezifischen- bzw. rezidivfreien Überleben [52, 62]. Ähnlich unseren Ergebnissen, wurde darüber hinaus auch in Adenokarzinomen der Lunge eine Assoziation zwischen der hohen Expression von cIAP1 mRNA und niedrigen Tumorstadien nachgewiesen [63]. In der Zusammenschau zeigen diese Daten, dass das Expressionsprofil von cIAPs zwischen verschiedenen Tumorentitäten stark variiert und deuten darauf hin, dass die zahlreichen Funktionen dieser und anderer IAPs offenbar vom jeweiligen Zelltyp abhängig sind. So können cIAP1 und cIAP2 zelltypabhängig beispielsweise entweder den klassischen NF- κ B Signaltransduktionsweg positiv oder aber den alternativen Transduktionsweg negativ regulieren und dadurch sowohl anti- als auch pro-apoptische Funktionen ausüben [33]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich Zellen mit einer Überexpression von cIAP1 aufgrund einer Störung der Mitose einerseits zwar langsamer teilen, andererseits aber eine verstärkte genetische Instabilität aufweisen [64]. Passend dazu konnte eine verstärkte cIAP1 Expression kürzlich auch als wichtiger Faktor im Rahmen der Tumorigenese von Lebertumoren identifiziert werden [46]. Vor dem Hintergrund dieser und unserer Ergebnisse könnte man darüber spekulieren, dass eine gesteigerte cIAP1 Expression auch in der frühen Entwicklungsphase von Nierenzellkarzinomen eine Rolle spielt. Unsere deskriptiven, mRNA basierten Daten erlauben diesbezüglich jedoch keine Rückschlüsse. Ungeachtet möglicher funktioneller Aspekte scheint eine gesteigerte transkriptionelle Expression von cIAP1 im Nierenzellkarzinom aber mit einem wenig aggressiven Tumorverhalten vergesellschaftet zu sein. Dies wird durch die in unserer Arbeit gezeigte unabhängige Korrelation der Überexpression von cIAP1 mit einer günstigen

Prognose unterstützt. Dabei konnten anhand ihres cIAP1 Expressionsprofils vor allem in der Subgruppe organüberschreitender Nierenzellkarzinome Patienten mit einer günstigen Prognose von denen mit einer eingeschränkten Prognose differenziert werden, was unter anderem auf ein Potential von cIAP1 als Marker zur Selektion von Patienten für adjuvante Therapieansätze hindeutet.

Im Vergleich zu cIAP1 und cIAP2, die auch in zahlreichen normalen humanen Geweben vorkommen, scheint die Expression des IAP Familienmitgliedes Livin, mit Ausnahme weniger adulter und fetaler Humangewebe, auf maligne Tumoren und Tumorzelllinien beschränkt [65, 66]. Hier konnte Livin bis dato in akuten Leukämien, Keimzelltumoren des Hodens, Melanomen, Neuroblastomen, Astrozytomen, Osteosarkomen, Mesotheliomen, Bronchial-, Nasopharynx-, Pankreas- und Urothelkarzinomen nachgewiesen werden [67-76]. In Anbetracht seines Expressions- und Funktionsprofils stellt Livin in solchen Tumoren sowohl einen potentiellen diagnostischen oder prognostischen Marker als auch ein attraktives Ziel innovativer Therapiestrategien dar [65, 77].

Zur Expression von Livin im Nierenzellkarzinom lagen zum Zeitpunkt unserer Publikation noch keine Daten vor. In unserer Arbeit konnten wir Livin in fast 40% der untersuchten Nierentumorproben, nicht aber in korrespondierenden Normalgeweben nachweisen. Dabei fand sich in Livin positiven Karzinomen jeweils eine simultane Expression beider Splicevarianten. In einer später veröffentlichten Arbeit berichteten Kitamura et al. über eine Livinexpression in 26 von 45 untersuchten Nierentumorproben und bestätigen somit weitgehend unser Ergebnis [78]. Der in unserer Analyse fehlende Nachweis von Livin im normalen Nierengewebe steht im Einklang mit den Resultaten dreier vorhergehender Studien, die Livin im adulten Nierengewebe ebenfalls nicht nachweisen konnten [75, 79, 80]. Im Gegensatz dazu wurde in fetalem Nierengewebe eine starke Livinexpression gefunden [45, 75]. In der Zusammenschau deuten diese Daten stark darauf hin, dass Livin möglicherweise nicht nur bei der Entwicklung der Niere, sondern durch seine Re-Expression auch bei der Entstehung von Nierenzellkarzinomen eine Rolle spielen könnte. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass wir Livin zum Teil bereits in sehr kleinen und gut differenzierten Nierenzellkarzinomen nachweisen konnten. Passend dazu wurde auf der Basis ähnlicher Ergebnisse auch eine Rolle von Livin im Rahmen der frühen Tumorigenese nicht-kleinzelliger Bronchialkarziome postuliert [74]. Allerdings zeigt

die Tatsache, dass wir Livin nur in weniger als der Hälfte der untersuchten Tumoren nachweisen konnten, dass Livin für die Tumorigenese von Nierenzellkarzinomen entweder nicht essentiell ist oder aber im Rahmen ihrer Progression zum Teil wieder verloren geht. Kürzlich publizierten Wagener et. al. eine weitere Arbeit, in der die Expression von Livin in 15 Nierenzellkarzinom- und 24 normalen Nierenparenchymproben analysiert wurde. Diese Arbeitsgruppe konnte Livin nicht nur in allen untersuchten Tumor-, sondern auch in sämtlichen Normalproben nachweisen. Allerdings beschreiben die Autoren, dass Livin im Tumorgewebe signifikant stärker exprimiert war als in den untersuchten Normalgeweben, in denen die Expression dicht an der Nachweisgrenze lag [81]. Inwieweit die Abweichung dieser Daten von unseren und früheren Ergebnissen durch eine unterschiedliche Sensitivität und Spezifität der angewendeten Analysemethoden bedingt ist, lässt sich derzeit nicht abschließend beurteilen. Ungeachtet der differenten Ergebnisse zur Expressionsfrequenz zeigen aber alle Arbeiten deutlich, dass Livin, wenn vorhanden, im Tumor verglichen mit normalem Nierengewebe deutlich höher exprimiert ist. Eine solche Überexpression von Livin korreliert in Neuroblastomen, Urothel- und Kolonkarzinomen mit einer Tumorprogression oder mit einer ungünstigen Prognose [67, 69, 82]. Für das Nierenzellkarzinom konnten wir hingegen weder eine Assoziation der Livinexpression mit ungünstigen histopathologischen Parametern noch mit einer limitierten Prognose nachweisen. Interessanterweise fand sich sogar ein deutlicher Trend in Richtung eines verlängerten rezidivfreien Überlebens von Patienten, deren Tumoren eine besonders hohe Expression von Livin aufwiesen. In einer erst 2008 publizierten Studie wurde die Livinexpression an 682 Nierentumorproben auch immunhistologisch untersucht. Während die zytoplasmatische Expression von Livin weder mit histopathologischen Parametern noch mit der Prognose assoziiert war, konnte eine hohe nukleäre Expression nicht nur als mit frühen Tumorstadien und einer guten Differenzierung assoziiert, sondern auch als unabhängiger Vorhersageparameter einer günstigen Prognose identifiziert werden [83]. Auch für die akute lymphatische Leukämie des Kindesalters konnte eine Korrelation der Expression von Livin mit einem verlängerten rezidivfreien Überleben gezeigt werden [68]. Für diese, im Hinblick auf die primär anti-apoptotische Funktion unerwartete Korrelation der Expression von Livin mit einer günstigen Prognose gibt es unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. So stellt Livin in Bronchialkarzinomen und Melanomen ein potentes Antigen einer Immunsystem vermittelten Tumorabwehr

dar, was auch durch den Nachweis von Livin Autoantikörpern im Serum von Patienten mit anderen Livin produzierenden Malignomen zum Ausdruck kommt [70, 84-89]. Neben Melanomen gehören auch Nierenzellkarzinome zu den hoch immunogenen Tumoren des Menschen [90]. Somit könnte Livin möglicherweise auch im Nierenzellkarzinom eine Immunantwort auslösen, die dann zu einer verbesserten Tumorkontrolle und Prognose beiträgt. Darüber hinaus konnten zahlreiche Arbeiten zeigen, dass die Funktionen der Livin Splicevarianten α und β stark vom jeweiligen Zelltyp und apoptotischen Stimulus abhängig sind [91-94]. So kann z.B. die α -Isoform in bestimmten Konstellationen auch pro-apoptotisch wirksam werden [45]. Des Weiteren führt die Spaltung von Livin durch Caspasen zur Entstehung einer verkürzten, pro-apoptotisch wirksamen Livinvariante, genannt tLivin, die vor allem in der perinukleären Region einer Zelle akkumuliert [95, 96]. Inwieweit dies aber für die beobachtete Korrelation einer verstärkten nukleären Livinexpression im Nierenzellkarzinom mit einer verbesserten Prognose von Bedeutung ist, müssen weitere Arbeiten zeigen [83]. Unabhängig von seinem Stellenwert als prognostischer Marker stellt Livin aufgrund seines Expressionsprofils ein attraktives Therapieziel dar. Neben den bereits erwähnten Livin basierten Immuntherapiestrategien konnten Crnkovic-Mertens et al. kürzlich zeigen, dass eine gezielte Inhibition der Livinexpression mittels siRNA-Technologie sowohl Lungentumor- als auch Nierenzellkarzinomzelllinien gegenüber diversen pro-apoptotischen Stimuli zu sensibilisieren vermag [93, 94]. In Anbetracht dieser und unserer Ergebnisse scheinen weitere Studien zur Evaluation der Relevanz von Livin als therapeutisches Ziel und prognostischer Marker im Nierenzellkarzinom sinnvoll.

4.2 Expressionsprofil und prognostische Bedeutung der IAP-Antagonisten Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 und XAF1 in Nierenzellkarzinomen

Die mitochondrial lokalisierten Proteine Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 können die anti-apoptotischen Funktionen diverser IAP-Familienmitglieder über Caspase abhängige und unabhängige Mechanismen inhibieren [97-108]. Entsprechend führt eine verstärkte bzw. eine reduzierte Expression dieser IAP-Antagonisten zu einer gesteigerten bzw. verminderten Apoptosesensibilität gegenüber verschiedenen pro-apoptotischen Stimuli [99, 104, 105, 108-116]. Dies wiederum impliziert, dass ein verändertes Expressionsniveau von Smac/DIABLO oder Omi/HtrA2 potentiell auch für die Entstehung, Progression und Prognose maligner Tumoren von Bedeutung

sein könnte. Dafür spricht, dass Smac/DIABLO zwar in allen bisher untersuchten Normalgeweben nachgewiesen werden konnte, von zahlreichen Karzinomen, Sarkomen und Lymphomen aber nicht exprimiert wird [98, 107, 117-119]. Weniger klar erscheint in diesem Zusammenhang die Rolle von Omi/HtrA2, welches in Prostata- und Zervixkarzinomen im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben sogar vermehrt exprimiert wird [120, 121].

Im Rahmen der Arbeiten zu Publikation 3 konnte eine mRNA Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in nahezu allen untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden. Dabei waren die Expressionsniveaus beider IAP-Antagonisten stark miteinander korreliert, was auf einen gemeinsamen transkriptionellen Regulationsmechanismus beider Gene im Nierenzellkarzinom hindeuten könnte. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 die Transkription von Smac/DIABLO reguliert, und dass auch der Omi/HtrA2 Promotor entsprechende Bindungsstellen für E2F1 aufweist [122].

Weder die Expression von Smac/DIABLO noch die von Omi/HtrA2 zeigte in unserer Arbeit eine Assoziation mit dem T-Stadium oder der Tumordifferenzierung. Während für Omi/HtrA2 bisher keine vergleichbaren Daten publiziert wurden, steht das Ergebnis für Smac/DIABLO im Einklang mit dem einer Arbeit von Yan et. al., in der sich auf Ebene der Transkription ebenfalls keine Korrelation der Smac/DIABLO Expression mit diesen Parametern im Nierenzellkarzinom nachweisen ließ [40]. Hingegen wurde auf Proteinebene über eine inverse Korrelation der Smac/DIABLO Expression mit der Progression des T- und G-Stadiums von Nierenzellkarzinomen berichtet [41]. Dieses Ergebnis steht jedoch prinzipiell nicht im Widerspruch zu den mRNA basierten Daten und ist möglicherweise durch posttranslationale Regulationsprozesse, wie z.B. eine Degradation von Smac/DIABLO durch im Nierenzellkarzinom verstärkt exprimierte IAPs zu erklären [123-125].

Ferner konnten wir eine niedrige mRNA Expression von Smac/DIABLO im Tumor als unabhängigen Vorhersageparameter eines deutlich verkürzten rezidivfreien- und tumorspezifischen Überlebens von Patienten nach operativer Entfernung eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms identifizieren. Eine entsprechende Korrelation fand sich in der univariaten Analyse auch für Omi/HtrA2, konnte aber im multivariaten Modell nicht bestätigt werden. Auch in Lungentumoren korreliert ein niedriges mRNA Expressionsniveau von Smac/DIABLO mit einer ungünstigen Prognose, was darauf

hindeutet, dass eine geringe Smac/DIABLO Expression mit besonders aggressiven Tumorphänotypen assoziiert ist [126]. Dies wird auch durch unsere Beobachtung unterstützt, dass das Expressionsniveau von Smac/DIABLO in Nierenzellkarzinomen mit primären Metastasen am niedrigsten, in denen, die sekundär Metastasen entwickelten intermediär und in denen, die im postoperativen Verlauf keine Metastasen entwickelten, am höchsten war. Passend dazu konnten Mizutani et al. zeigen, dass Smac/DIABLO in Nierenzellkarzinometastasen deutlich niedriger exprimiert wird als im korrespondierenden Gewebe des Primärtumors [41]. Ferner beobachtete diese Arbeitsgruppe, dass die Expression von Smac/DIABLO im Nierenzellkarzinom, verglichen mit normalem Nierenparenchym, signifikant erniedrigt und die fehlende Expression im Tumor in einer univariaten Überlebensanalyse ebenfalls mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet war [41]. Neben Studien zur Validierung von Smac/DIABLO als Prognoseparameter scheint in Anbetracht dieser und unserer Ergebnisse auch die weiterführende Evaluation der Wirkung synthetisch hergestellter Smac-Mimetika, von denen sich einige bereits in der klinischen Prüfung befinden, in der Therapie des Nierenzellkarzinoms lohnenswert [33, 56, 127, 128]

Ähnlich wie die mitochondrialen IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2, vermag auch die Expression des Interferon stimulierbaren, vermeintlichen Tumorsuppressorgens XAF1 Tumorzellen gegenüber Apoptose induzierenden Stimuli zu sensibilisieren [129, 130]. Die pro-apoptotischen Effekte dieses überwiegend nukleär lokalisierten IAP-Antagonisten werden dabei sowohl durch Sequestrierung von XIAP und Degradation von Survivin als auch durch IAP unabhängige Mechanismen vermittelt [129, 131-133]. XAF1 wird in den meisten Tumorzelllinien nur auf einem niedrigem Niveau oder gar nicht exprimiert [129, 134]. Auch im Tumorgewebe von Melanomen, Magen-, Kolon-, und Urothelkarzinomen konnte in unterschiedlicher Frequenz eine gegenüber den entsprechenden Normalgeweben verminderte Expression von XAF1 nachgewiesen werden [133, 135-137]. Als Ursachen dieser Expressionsreduktion fanden sich teils genetische (Verlust der Heterozygotie) teils epigenetische (Promotormethylierung) Veränderungen des XAF1 Gens [133, 136, 138-140]. Auf der Basis dieser Erkenntnisse untersuchten wir im Rahmen der Arbeiten zu den Publikationen 4 und 5 den Stellenwert der Promotormethylierung für die transkriptionelle Regulation des XAF1 Gens im

Nierenzellkarzinom und potentielle Korrelationen der XAF1 mRNA- und Proteinexpression mit histopathologischen Tumorcharakteristika sowie der Prognose von Nierenzellkarzinompatienten.

Entsprechend den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen an Kolon- und Magenkarzinomzelllinien konnten wir auch in den untersuchten Nierenzellkarzinomproben eine inverse Korrelation der XAF1 mRNA Expression mit dem normalisierten Methylierungsindex, d.h. mit der Stärke der Methylierung nachweisen [140]. Allerdings war die Frequenz methylierter Nierenzellkarzinomproben deutlich geringer, als in anderen Tumorentitäten wie Magen- und Urothelkarzinomen [133, 136]. So war interessanterweise in keiner der sechs XAF1 mRNA negativen Tumorproben eine Methylierung des XAF1 Promotors nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Promotormethylierung für die Regulation des XAF1 Gens im Nierenzellkarzinom allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt.

Im Rahmen unserer Expressionsanalysen konnten wir zeigen, dass eine niedrige Proteinexpression von XAF1 mit der Progression des T- und G-Stadiums klarzelliger Nierenzellkarzinome korreliert. Hingegen war die mRNA Expression von XAF1 im Tumorgewebe nicht mit histopathologischen Parametern assoziiert. In Magen-, Kolon- und Urothelkarzinomen wurden entsprechende Korrelationen bis dato nur auf Ebene der mRNA gezeigt [133, 136, 139]. Da das mRNA Expressionsniveau von XAF1 im Tumor aber keine Rückschlüsse auf die Höhe der Proteinexpression zulässt, erlauben diese Daten prinzipiell keine Rückschlüsse auf die mögliche Bedeutung einer verminderten transkriptionellen XAF1 Expression für die Tumorbilogie solcher Karzinome [130]. Kürzlich konnte in hepatozellulären Karzinomen aber auch auf Proteinebene erstmals die Korrelation einer niedrigen XAF1 Expression mit fortgeschrittenen T- und G-Stadien nachgewiesen werden, was die funktionelle Relevanz einer verminderten Expression von XAF1 für die Progression verschiedener Tumorentitäten, einschließlich des Nierenzellkarzinoms, unterstützt. Die im Vergleich zu benignen Nävi deutlich reduzierte XAF1 Proteinexpression in Melanomen suggeriert ferner, dass eine verringerte XAF1 Expression möglicherweise aber auch bereits im Rahmen der Tumorigenese eine Rolle spielt [137]. Im Hinblick auf das Nierenzellkarzinom lassen unsere Ergebnisse diesbezüglich keine Rückschlüsse zu. Dagegen spricht zwar das Fehlen signifikanter Unterschiede in der medianen XAF1 Proteinexpression zwischen Tumor- und

Normalgewebe, jedoch ist allein vor dem Hintergrund der beobachteten Expressionsschwankungen zwischen den untersuchten Normalproben eine paarweise Analyse der XAF1 Expression in korrespondierenden Tumor- und Normalproben zur weiteren Klärung dieser Frage unverzichtbar.

Des Weiteren kamen wir zu dem Ergebnis, dass sowohl eine niedrige XAF1 mRNA- als auch eine niedrige XAF1 Proteinexpression im Nierenzellkarzinom mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist. Ein vom T- und G-Stadium unabhängiger prognostischer Effekt konnte aber nur auf Ebene der Transkription nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis eines unabhängigen prognostischen Stellenwertes auf Proteinebene ist möglicherweise durch die hier nachweisbare inverse Korrelation der XAF1 Expression mit etablierten histopathologischen Prognoseparametern bedingt. Ähnlich der niedrigen Proteinexpression von XAF1 ist auch eine hohe Proteinexpression seiner Gegenspieler XIAP und Survivin im Nierenzellkarzinom mit der Progression des T- und G-Stadiums vergesellschaftet [17, 39]. Dennoch konnte sowohl für XIAP als auch für Survivin ein unabhängiger prognostischer Effekt nachgewiesen werden [17, 39]. Im Magenkarzinom hingegen ist nicht die Expression von XIAP allein, sondern ein gestörtes Verhältnis zwischen der Expression von XIAP und XAF1 prognostisch relevant [141]. Dies impliziert, dass möglicherweise auch die kombinierte Untersuchung von XAF1, XIAP und Survivin im Nierenzellkarzinom zu einer Verbesserung des prognostischen Stellenwertes der Einzelparameter beitragen könnte.

Reu et al. konnten kürzlich zeigen, dass eine Reduktion der Expression von XAF1 eine vermehrte Resistenz, eine Steigerung seiner Expression hingegen eine verstärkte Sensibilität der Nierenzellkarzinomzelllinie ACHN gegenüber einer Apoptoseinduktion durch Interferon vermittelt [142]. XAF1 stellt somit nicht nur ein Interferon stimulierbares Gen dar, sondern spielt offenbar auch bei der Vermittlung der Antitumorwirkung von Interferon eine Rolle [130, 142]. Es wäre somit denkbar, dass sowohl eine unzureichende Steigerung der XAF1 Expression durch Interferon als auch eine primär verminderte XAF1 Expression im Tumorgewebe zum meist schlechten Ansprechen der meisten Nierenzellkarzinome auf eine Interferontherapie beitragen [143, 144]. Aufgrund der geringen Ansprechraten ist eine Monotherapie metastasierter Nierenzellkarzinome mit Interferon- α heute zwar obsolet, jedoch stellt seine Kombination mit Bevacizumab eine kürzlich neu zugelassene Erstlinientherapieoption dar [145]. Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der

Tatsache, dass sich eine Adenovirus-vermittelte XAF1 Induktion im Mausmodell unlängst als effektive Tumorthherapie erwies, scheint eine weiterführende Untersuchung des therapeutischen Potentials von XAF1 im Nierenzellkarzinom besonders vielversprechend [146].

5. Limitierungen und Ausblick

Zur besseren Einschätzung des klinischen und biologischen Stellenwertes der Ergebnisse unserer Arbeiten sei, zusätzlich zu den bereits im Rahmen der Diskussion erwähnten Einschränkungen, nochmals explizit auf die wesentlichen Limitierungen unserer Studien hingewiesen. Alle Untersuchungen waren retrospektiv. Dies ist für die erste Evaluation potentieller Prognoseparameter zwar ein vielfach gewählter Versuchsansatz, jedoch bedürfen die Ergebnisse solcher Arbeiten vor ihrem Eingang in die Klinik stets der Validierung im Rahmen prospektiver Studien [147, 148]. Des Weiteren sind unsere Arbeiten als rein deskriptiv und die durchgeführten multivariaten Analysen als explorativ zu betrachten. Wichtigster Kritikpunkt im Hinblick auf die multivariaten Modelle unserer Studien ist die relativ geringe Anzahl eingeschlossener Patienten und die somit limitierte statistische Power. Dies spiegelt sich z.B. darin wieder, dass das G-Stadium, als ein bereits etablierter unabhängiger Prognoseparameter, zwar in einigen univariaten, nicht aber in den meisten multivariaten Analysen unserer Arbeiten als prognostisch relevant identifiziert werden konnte [149]. Diesbezüglich sei jedoch erwähnt, dass, abgesehen von unserer Studie zur Proteinexpression von XAF1, die Anzahl der in die anderen Arbeiten eingeschlossenen, gut differenzierten Nierenzellkarzinome extrem gering war. Andererseits wird die Aussagekraft unserer multivariaten Analysen aber auch dadurch eingeschränkt, dass, abgesehen von einer Adjustierung für Alter, Geschlecht, T-, G- und M-Stadium, aufgrund der limitierten Fallzahl keine weiteren bereits validierten und in der klinischen Routine etablierten Prognoseparameter wie z.B. der ECOG-Performance Status in diese Modelle integriert werden konnten [150]. In diesem Zusammenhang sind zur besseren Einschätzung des prognostischen Potentials der hier untersuchten Parameter zukünftig auch Vergleiche mit anderen, bereits besser charakterisierten molekularen Prognosefaktoren wie z.B. der Carboanhydrase IX zu fordern [151, 152]. Ob, und wenn ja, wie viel Zugewinn an prognostischer Aussagekraft die im Rahmen unserer Arbeiten erstmalig untersuchten IAPs und IAP-Antagonisten zu bereits etablierten Prognosefaktoren letztlich liefern können, bedarf somit ihrer prospektiven Re-Evaluation in deutlich größeren sowie klinisch, laborchemisch und im Idealfall auch molekular besser charakterisierten Patientenkollektiven.

Da die unterschiedlichen histologischen Subtypen von Nierenzellkarzinomen histogenetisch und in ihrer Tumorbilogie nicht vergleichbar sind, sollten weitere Studien darüber hinaus möglichst nur auf eine Entität, z.B. auf die am häufigsten vorkommenden klarzelligen Nierenzellkarzinome fokussiert sein [1, 7]. Dieser Aspekt fand nur in unseren Untersuchungen zur mRNA Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 und zur Proteinexpression von XAF1 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen entsprechende Berücksichtigung.

Wie bereits erwähnt steht, mit Ausnahme der Arbeiten zur Expression von Livin und XAF1, eine Bestätigung unserer mRNA basierten Ergebnisse auf Proteinebene aus, so dass funktionelle Rückschlüsse aus den Ergebnissen für cIAP1, cIAP2, Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 kaum möglich sind. So könnte es sich z.B. bei der beobachteten Korrelation einer Überexpression von cIAP1 mRNA mit einer günstigen Prognose von Nierenzellkarzinompatienten schlicht um ein Epiphänomen ohne funktionelle Relevanz handeln. Dafür spricht unter anderem, dass eine hohe Proteinexpression von cIAP1 in anderen Tumoren mit einer eher schlechten Prognose assoziiert ist [60, 61, 153].

Ein weiterer Nachteil unsrer RT-PCR basierten Arbeiten war die fehlende Möglichkeit eine Aussage über die zelluläre Lokalisation der untersuchten Parameter in den untersuchten Geweben zu treffen. Das dieser Aspekt jedoch von entscheidender Relevanz sein kann zeigt z.B. die immunhistologische Untersuchung von Haferkamp et al., in der zwar die nukleäre, nicht aber die zytoplasmatische Expression von Livin als prognostischer Faktor im Nierenzellkarzinom identifiziert werden konnte [83].

Trotz solcher Einschränkungen stellen die Ergebnisse unserer Arbeiten eine Grundlage für die zukünftige Evaluation des prognostischen Stellenwertes sowie der funktionellen Bedeutung von IAPs und ihren Antagonisten im Nierenzellkarzinom dar. Um zu klären welcher, der in unseren und anderen Studien untersuchten IAPs oder IAP-Antagonisten im Nierenzellkarzinom das größte prognostische Potential besitzt, planen wir derzeit, sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression aller Parameter an nur einem, einheitlichen Patientenkollektiv inklusive korrespondierender Normalgewebe erneut zu analysieren. Dieser Ansatz bietet darüber hinaus die Möglichkeit, potentielle Störungen im Gleichgewicht der Expression von IAPs und ihren Gegenspielern im Nierenzellkarzinom zu erkennen, was besonders vor dem Hintergrund der multiplen Interaktionen dieser Parameter untereinander relevant

erscheint. So konnten Yan et al. zeigen, dass ein in Richtung von XIAP verschobenes Gleichgewicht der Expression von XIAP und Smac/DIABLO im Nierenzellkarzinom mit einer Tumorprogression vergesellschaftet ist [40]. Des Weiteren wurde kürzlich ein zugunsten von XIAP verändertes Expressionsverhältnis zwischen XIAP und XAF1 im Magenkarzinom als Vorhersageparameter einer ungünstigen Prognose beschrieben [141].

Eine verminderte Anfälligkeit von Tumorzellen gegenüber der Apoptose gilt weiterhin als wichtigster Faktor für die Resistenz gegenüber einer Chemo- oder Strahlentherapie [19]. Diese Resistenz ist in Nierenzellkarzinomen außergewöhnlich stark ausgeprägt und auch die Ansprechraten auf eine Therapie mit Interferon- α sind gering [9, 10]. Im Rahmen unserer und anderer deskriptiver Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl die verstärkte Proteinexpression von XIAP und Survivin als auch die verminderte Proteinexpression von Smac/DIABLO und XAF1 im Nierenzellkarzinom mit einer Tumorprogression assoziiert ist [39, 41, 59]. Des Weiteren konnten unsere und andere Arbeitsgruppen in einer beträchtlichen Anzahl von Nierenzellkarzinomen eine Überexpression von Livin nachweisen [81]. Die biologische Relevanz dieser Ergebnisse wird durch Daten funktionell ausgerichteter Arbeiten unterstützt, aus denen sich möglicherweise auch Perspektiven für die Entwicklung innovativer Therapiestrategien ergeben. So lässt sich z.B. durch Induktion von XAF1 die Sensibilität von Nierenzellkarzinomzelllinien gegenüber Interferon steigern [142]. Ferner konnte sowohl durch Transfektion von Nierenzellkarzinomzelllinien mit Smac/DIABLO cDNA als auch durch deren Behandlung mit siRNAs gegen Survivin oder Livin eine deutliche Steigerung ihrer Empfindlichkeit gegenüber diversen pro-apoptotischen Stimuli erreicht werden [41, 94, 154]. Kürzlich berichteten Bilim et al. über eine Potenzierung des zytotoxischen Effekts von Cisplatin auf Nierenzellkarzinomzellen durch zusätzliche Applikation eines, dem endogenen Smac/DIABLO in seiner Funktion entsprechenden, Smac-Peptids [155]. In Zusammenschau all dieser Ergebnisse liegt es nahe, das therapeutische Potential zahlreicher in der Entwicklung befindlicher und teilweise bereits in klinischen Studien eingesetzter IAP-antagonistischer Therapiestrategien („IAP-targeted therapies“) zukünftig auch im Nierenzellkarzinom verstärkt zu evaluieren [31, 33, 34, 56, 128, 146]. Dazu gehört prinzipiell auch die weiterführende Evaluation von Livin als potentiell Ziel einer Immuntherapie. Vakzinierungsstudien bei Melanompatienten konnten Livin unlängst als potentes Antigen einer

Immunsystem vermittelten Tumorabwehr ausweisen [84, 85]. Aufgrund der geringen Toxizität und Nebenwirkungsrate sind Vakzinierungstherapieansätze trotz ihrer bis dato limitierten Erfolge auch im Nierenzellkarzinom weiterhin Gegenstand intensiver Forschung [156]. Analog zu den Arbeiten am Melanom erscheint es auch im Nierenzellkarzinom sinnvoll zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Expression von Livin im Tumorgewebe und dem Ansprechen auf eine autologe Tumorstoffimpfung besteht.

XAF1 ist sowohl durch Interferon induzierbar als auch an der Vermittlung der Interferonwirkung selbst beteiligt [130, 142]. Neben einer zukünftigen Evaluation seines therapeutischen Potentials scheinen somit weitere Untersuchungen im Hinblick die potentielle Eignung von XAF1 als Surrogatparameter für das Ansprechen auf Interferon- α beinhaltende Therapieregime gerechtfertigt. Das XAF1 als prädiktiver Biomarker Potential besitzt, konnte erst kürzlich im Rahmen der neoadjuvanten Chemotherapie fortgeschrittener Urothelkarzinome der Harnblase demonstriert werden [157]. Eine immunhistologische Untersuchung der Expression von XAF1 am Tumorgewebe eines großen Kollektivs immuntherapierter Patienten mit einem metastasierten, klarzelligem Nierenzellkarzinom ist unter diesem Aspekt bereits in Arbeit.

6. Zusammenfassung

Die derzeit eingesetzten Modelle zur Abschätzung der Prognose von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom basieren vornehmlich auf der Integration histopathologischer, klinischer und laborchemischer Faktoren. Man geht jedoch davon aus, dass der zusätzliche Einschluss molekularer Parameter, die die individuelle Tumorbiologie besser widerspiegeln, die Vorhersagegenauigkeit dieser Modelle noch deutlich verbessern kann. Da einer Fehlregulation der Apoptose eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung, Progression und Therapierefraktärität maligner Tumoren zukommt, haben die IAP (inhibitor of apoptosis)-Proteinfamilie und deren Antagonisten diesbezüglich möglicherweise großes Potential. Schwerpunkt meiner Arbeiten war es deshalb, erstmalig das Expressionsprofil der IAP-Familienmitglieder cIAP1, cIAP2 und Livin sowie das der IAP-Antagonisten Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 und XAF1 im Nierenzellkarzinom zu untersuchen und auf mögliche Korrelationen mit der Aggressivität und Prognose dieser Tumoren hin zu überprüfen.

Methodisch kamen im Rahmen dieser Studien die real-time RT-PCR, die quantitative methylierungsspezifische PCR, immunhistochemische Untersuchungen und Western Blot Analysen zum Einsatz.

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Expression der Apoptoseinhibitoren cIAP1, cIAP2 und Livin in Nierenzellkarzinom- und korrespondierenden Normalgeweben konnten wir zeigen, dass die mRNA von cIAP1 und cIAP2 in den meisten Nierenzellkarzinomen verstärkt exprimiert wird. Im Falle von cIAP1 war diese Überexpression unabhängig vom T- und G-Stadium mit einer mit einer günstigen Prognose assoziiert, wobei der prognostische Effekt innerhalb der Gruppe der pT3 Tumoren besonders ausgeprägt war.

Eine mRNA Expression der Livin Splicevarianten α und β ließ sich in ca. 40% der untersuchten Karzinome, nicht aber im normalen Nierenparenchym nachweisen. Dieses Ergebnis konnte mittels stichprobenartig durchgeführter Western Blot Analysen auf Proteinebene bestätigt werden. Signifikante Korrelation der Expression von Livin mit histopathologischen Parametern oder der Prognose fanden sich nicht.

Die Untersuchung zur mRNA Expression der mitochondrialen IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 im klarzelligen Nierenzellkarzinom war ausschließlich auf Tumorproben beschränkt. Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 waren in nahezu allen

Tumorgewebe exprimiert, wobei die Expressionsniveaus beider Parameter eng miteinander korrelierten. Während in einer univariaten Analyse sowohl die niedrige Expression von Smac/DIABLO als auch die von Omi/HtrA2 mit einem verkürzten rezidivfreien- und tumorspezifischem Überleben vergesellschaftet war, konnte dieser Zusammenhang im multivariaten Modell nur für Smac/DIABLO bestätigt werden.

Die Untersuchung zur transkriptionellen Expression und Promotormethylierung von XAF1 in Nierenzellkarzinomen erfolgte ebenfalls ausschließlich an Tumorgewebe. Eine niedrige mRNA Expression von XAF1 im Tumor vermochte unabhängig vom T-, G- und M-Stadium eine ungünstige Prognose vorherzusagen. Dieser prognostische Effekt war dabei, ähnlich wie für cIAP1 gezeigt, in der Gruppe von Patienten mit pT3 Tumoren besonders stark ausgeprägt. Eine Methylierung des XAF1 Promotors konnte nur in 10% der untersuchten Proben nachgewiesen werden, wobei die XAF1 Expression dieser Proben erwartungsgemäß invers mit der Stärke der Methylierung korrelierte. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse untersuchten wir schließlich auch die Proteinexpression von XAF1 in einem größeren Kollektiv von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen und einigen unabhängigen normalen Nierenparenchymproben. Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe konnten nicht nachgewiesen werden. Eine niedrige XAF1 Expression im Tumor war aber signifikant mit einer Progression des T- und G-Stadiums und in der univariaten Analyse auch mit einer limitierten Prognose assoziiert. Als ein von diesen histopathologischen Parametern unabhängiger prognostischer Faktor konnte XAF1 in dieser Arbeit hingegen nicht identifiziert werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass unter den in diesen Arbeiten untersuchten IAPs wahrscheinlich nur cIAP1 Potential als Prognoseparameter im Nierenzellkarzinom besitzt. Livin stellt allerdings aufgrund seiner isolierten Expression im Tumor prinzipiell ein attraktives therapeutisches Ziel dar. Aus der Gruppe IAP-Antagonisten scheinen sowohl Smac/DIABLO als auch XAF1 einen prognostischen Stellenwert zu haben, den es nun in größeren, prospektiven Studien weiter zu untersuchen gilt.

7. Literaturverzeichnis

1. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335:865-75.
2. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* 2006; 49:798-805.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
4. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Declining mortality from kidney cancer in Europe. *Ann Oncol* 2004; 15:1130-5.
5. Nguyen CT, Campbell SC, Novick AC. Choice of operation for clinically localized renal tumor. *Urol Clin North Am* 2008; 35:645-55.
6. Curti BD. Renal cell carcinoma. *Jama* 2004; 292:97-100.
7. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2477-90.
8. Motzer RJ, Mazumdar M. Predicting survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urology* 2004; 43 Suppl 3:135-6.
9. Motzer RJ, Russo P, Nanus DM, Berg WJ. Renal cell carcinoma. *Curr Probl Cancer* 1997; 21:185-232.
10. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD001425.
11. Patard JJ, Pouessel D, Bensalah K, Culine S. Targeted therapy in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2008; 26:135-40.
12. Ravaud A, Wallerand H, Culine S, Bernhard JC, Fergelot P, Bensalah K, Patard JJ. Update on the medical treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2008; 54:315-25.
13. Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Beldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* 2005; 173:1853-62.
14. Lam JS, Breda A, Beldegrun AS, Figlin RA. Evolving principles of surgical management and prognostic factors for outcome in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:5565-75.
15. Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Vasmataz G. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5128-39.
16. Lam JS, Leppert JT, Figlin RA, Beldegrun AS. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Urology* 2005; 66:1-9.
17. Parker AS, Kosari F, Lohse CM, Houston Thompson R, Kwon ED, Murphy L, Riehle DL, Blute ML, Leibovich BC, Vasmataz G, Cheville JC. High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2006; 107:37-45.
18. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:2941-53.
19. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:277-88.
20. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; 26:1324-37.
21. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22:8590-607.

22. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 1996; 15:2685-94.
23. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:239-52.
24. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17:3247-59.
25. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; 64:7183-90.
26. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:401-10.
27. Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 1999; 19:388-98.
28. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17:3237-45.
29. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 2008; 30:123-35.
30. Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 2008; 7:1036-46.
31. Fulda S. Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8:533-9.
32. Vucic D, Fairbrother WJ. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:5995-6000.
33. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008; 27:6252-75.
34. Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia* 2008.
35. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 100:30-6.
36. Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology* 2007; 69:34-7.
37. Parker AS, Lohse CM, Leibovich BC, Cheville JC, Sheinin YM, Kwon ED. Comparison of digital image analysis versus visual assessment to assess survivin expression as an independent predictor of survival for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39:1176-84.
38. Zamparese R, Pannone G, Santoro A, Lo Muzio L, Corsi F, Pedicillo MC, Scillitani EL, Tortorella S, Staibano S, Piscuoglio S, Lo Russo L, Bufo P. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 2008; 26:929-35.
39. Ramp U, Krieg T, Caliskan E, Mahotka C, Ebert T, Willers R, Gabbert HE, Gerharz CD. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Hum Pathol* 2004; 35:1022-8.
40. Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Wethkamp N, Liebmann J, Suschek CV, Guo Y, Gabbert HE, Gerharz CD, Ramp U. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 2004; 91:1349-57.
41. Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubara H, Mikami K, Okihara K, Kawauchi A, Bonavida B, Miki T. Downregulation of Smac/DIABLO

- expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J Clin Oncol* 2005; 23:448-54.
42. Weikert S, Christoph F, Kollermann J, Muller M, Schrader M, Miller K, Krause H. Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int J Mol Med* 2005; 16:349-53.
 43. Weikert S, Krause H, Wolff I, Christoph F, Schrader M, Emrich T, Miller K, Muller M. Quantitative evaluation of telomerase subunits in urine as biomarkers for noninvasive detection of bladder cancer. *Int J Cancer* 2005; 117:274-80.
 44. Weikert S, Christoph F, Schrader M, Krause H, Miller K, Muller M. Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer* 2005; 116:100-4.
 45. Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 2001; 495:56-60.
 46. Zender L, Spector MS, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C, Silke J, Fan ST, Luk JM, Wigler M, Hannon GJ, Mu D, Lucito R, Powers S, Lowe SW. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 2006; 125:1253-67.
 47. Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, Ohki M, Inazawa J. Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61:6629-34.
 48. Gordon GJ, Appasani K, Parcels JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002; 23:1017-24.
 49. Esposito I, Kleeff J, Abiatari I, Shi X, Giese N, Bergmann F, Roth W, Friess H, Schirmacher P. Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer. *J Clin Pathol* 2007; 60:885-95.
 50. Espinosa M, Cantu D, Herrera N, Lopez CM, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Inhibitors of Apoptosis Proteins in human cervical cancer. *BMC Cancer* 2006; 6:45.
 51. Endo T, Abe S, Seidler HB, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, Kitagawa M, Hirokawa K. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:770-6.
 52. Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang X, Turner B, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Shabaik A, Vitiello A, Peehl D, Gao GJ, Reed JC. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4914-25.
 53. Dai Z, Zhu WG, Morrison CD, Brena RM, Smiraglia DJ, Raval A, Wu YZ, Rush LJ, Ross P, Molina JR, Otterson GA, Plass C. A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet* 2003; 12:791-801.
 54. Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by

- suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* 2003; 63:7076-80.
55. Leung SK, Ohh M. Playing Tag with HIF: The VHL Story. *J Biomed Biotechnol* 2002; 2:131-35.
 56. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12:1543-68.
 57. Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schaffer AA, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1999; 155:267-74.
 58. Jiang F, Moch H, Richter J, Egenter C, Gasser T, Bubendorf L, Gschwind R, Sauter G, Mihatsch MJ. Comparative genomic hybridization reveals frequent chromosome 13q and 4q losses in renal carcinomas with sarcomatoid transformation. *J Pathol* 1998; 185:382-8.
 59. Mizutani Y, Nakanishi H, Li YN, Matsubara H, Yamamoto K, Sato N, Shiraishi T, Nakamura T, Mikami K, Okihara K, Takaha N, Ukimura O, Kawauchi A, Nonomura N, Bonavida B, Miki T. Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis. *Int J Oncol* 2007; 30:919-25.
 60. Psyrrri A, Yu Z, Bamias A, Weinberger PM, Markakis S, Kowalski D, Camp RL, Rimm DL, Dimopoulos MA. Evaluation of the prognostic value of cellular inhibitor of apoptosis protein in epithelial ovarian cancer using automated quantitative protein analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1179-83.
 61. Tanimoto T, Tsuda H, Imazeki N, Ohno Y, Imoto I, Inazawa J, Matsubara O. Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2005; 224:141-51.
 62. Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Jonker JM, Postmus PE, Kruijt FA, Giaccone G. Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2001; 12:799-805.
 63. Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128:554-60.
 64. Samuel T, Okada K, Hyer M, Welsh K, Zapata JM, Reed JC. cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer Res* 2005; 65:210-8.
 65. Liu B, Han M, Wen JK, Wang L. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment. *Cancer Lett* 2007; 250:168-76.
 66. Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruijt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Hum Pathol* 2006; 37:78-86.
 67. Kim DK, Alvarado CS, Abramowsky CR, Gu L, Zhou M, Soe MM, Sullivan K, George B, Schemankewitz E, Findley HW. Expression of inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome. *Pediatr Dev Pathol* 2005; 8:621-9.
 68. Choi J, Hwang YK, Sung KW, Lee SH, Yoo KH, Jung HL, Koo HH, Kim HJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 109:471-7.

69. Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Sacconi G, Frati L, Agliano AM. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2003; 14:85-90.
70. Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Hariu M, Tamura Y, Aketa K, Nabeta C, Nakanishi K, Kamiguchi K, Mano Y, Kitamura H, Kobayashi J, Tsukahara T, Shijubo N, Sato N. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1000-9.
71. Kempkensteffen C, Hinz S, Krause H, Jager T, Kollermann J, Weikert S, Christoph F, Schostak M, Miller K, Schrader M. Expression of Splicing Variants of the Inhibitor of Apoptosis Livin in Testicular Germ Cell Tumors. *Tumour Biol* 2008; 29:76-82.
72. Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q. Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65:905-13.
73. Nedelcu T, Kubista B, Koller A, Sulzbacher I, Mosberger I, Arrich F, Trieb K, Kotz R, Toma CD. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134:237-44.
74. Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Watanabe N. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46:299-304.
75. Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 2000; 10:1359-66.
76. Xiang Y, Yao H, Wang S, Hong M, He J, Cao S, Min H, Song E, Guo X. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2006; 116:126-30.
77. Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:24-30.
78. Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Hariu H, Asanuma H, Hirohashi Y, Sato E, Sato N, Tsukamoto T. Expression of livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients. *Urology* 2007; 70:38-42.
79. Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276:3238-46.
80. Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:820-31.
81. Wagener N, Crnkovic-Mertens I, Vetter C, Macher-Goppinger S, Bedke J, Grone EF, Zentgraf H, Pritsch M, Hoppe-Seyler K, Buse S, Haferkamp A, Autschbach F, Hohenfellner M, Hoppe-Seyler F. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and non-tumorous adult kidney. *Br J Cancer* 2007; 97:1271-6.
82. Li JH, He WJ, He YJ. [Expression and clinical significance of Survivin and Livin in Dukesob colorectal cancer]. *Ai Zheng* 2007; 26:547-51.
83. Haferkamp A, Bedke J, Vetter C, Pritsch M, Wagener N, Buse S, Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler K, Macher-Goeppinger S, Hoppe-Seyler F, Autschbach F, Hohenfellner M. High nuclear Livin expression is a favourable prognostic indicator in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2008; 102:1700-6.
84. Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, Maecker B, Schultze JL, Hodi FS, Soiffer RJ, Jung K, Kuroda MJ, Letvin NL, Greenfield EA, Mihm M, Kutok

- JL, Dranoff G. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:3398-403.
85. Schmollinger JC, Dranoff G. Targeting melanoma inhibitor of apoptosis protein with cancer immunotherapy. *Apoptosis* 2004; 9:309-13.
 86. Andersen MH, Reker S, Becker JC, Straten P. The melanoma inhibitor of apoptosis protein: a target for spontaneous cytotoxic T cell responses. *J Invest Dermatol* 2004; 122:392-9.
 87. Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49:1206-8.
 88. Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 362:125-30.
 89. Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer* 2005; 48:217-21.
 90. Gouttefangeas C, Stenzl A, Stevanovic S, Rammensee HG. Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2006.
 91. Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* 2003; 22:8330-6.
 92. Crnkovic-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, Butz K. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells. *J Mol Med* 2006; 84:232-40.
 93. Crnkovic-Mertens I, Muley T, Meister M, Hartenstein B, Semzow J, Butz K, Hoppe-Seyler F. The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2006; 54:135-42.
 94. Crnkovic-Mertens I, Wagener N, Semzow J, Grone EF, Haferkamp A, Hohenfellner M, Butz K, Hoppe-Seyler F. Targeted inhibition of Livin resensitizes renal cancer cells towards apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1137-44.
 95. Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, Peretz T, Mandelboim O, Ben-Yehuda D. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma. *Cancer Res* 2003; 63:6340-9.
 96. Nachmias B, Lazar I, Elmalech M, Abed-El-Rahaman I, Ashhab Y, Mandelboim O, Perlman R, Ben-Yehuda D. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of Livin. *Apoptosis* 2007; 12:1129-42.
 97. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJ, Flygare JA, Fairbrother WJ, Deshayes K, Dixit VM, Vucic D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 2007; 131:669-81.
 98. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.

99. Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7:163-6.
100. Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro MT, Kadkhodayan S, Fairbrother WJ, Dixit VM. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J Biol Chem* 2002; 277:12275-9.
101. Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* 2008; 15:453-60.
102. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002; 9:20-6.
103. Yang QH, Du C. 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* 2004; 279:16963-70.
104. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17:1487-96.
105. Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* 2003; 278:31469-72.
106. Martins LM, Turk BE, Cowling V, Borg A, Jarrell ET, Cantley LC, Downward J. Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* 2003; 278:49417-27.
107. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102:33-42.
108. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277:432-8.
109. Yang X, Xing H, Gao Q, Chen G, Lu Y, Wang S, Ma D. Regulation of HtrA2/Omi by X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005; 97:413-21.
110. Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J Biol Chem* 2002; 277:44236-43.
111. Cilenti L, Lee Y, Hess S, Srinivasula S, Park KM, Junqueira D, Davis H, Bonventre JV, Alnemri ES, Zervos AS. Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* 2003; 278:11489-94.
112. Cilenti L, Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Stratico V, Yerkes A, Park KM, Sheridan AM, Alnemri ES, Bonventre JV, Zervos AS. Omi/HtrA2 protease mediates cisplatin-induced cell death in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F371-9.
113. Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 2002; 8:808-15.
114. Kashkar H, Seeger JM, Hombach A, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermohlen O, Heimlich G, Abken H, Kronke M. XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood* 2006; 108:3434-40.

115. Pruefer FG, Lizarraga F, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Participation of Omi Htra2 serine-protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells. *J Chemother* 2008; 20:348-54.
116. Zhao J, Jin J, Zhang X, Shi M, Dai J, Wu M, Wang R, Guo Y. Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo. *Cancer Gene Ther* 2006; 13:420-7.
117. Ren Y, Akyurek N, Schlette E, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Expression of Smac/DIABLO in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Hum Pathol* 2006; 37:1407-13.
118. Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, Park WS, Park CH, Jeon HM, Jung ES, Lee JY, Lee SH. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *Apmis* 2003; 111:382-8.
119. Tikoo A, O'Reilly L, Day CL, Verhagen AM, Pakusch M, Vaux DL. Tissue distribution of Diablo/Smac revealed by monoclonal antibodies. *Cell Death Differ* 2002; 9:710-6.
120. Hu XY, Xu YM, Chen XC, Ping H, Chen ZH, Zeng FQ. Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Apmis* 2006; 114:893-8.
121. Gabriel B, Hausen AZ, Bouda J, Boudova L, Koprivova M, Hirschfeld M, Jager M, Stickeler E. Significance of nuclear hTra2-beta1 expression in cervical cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88:216-21.
122. Xie W, Jiang P, Miao L, Zhao Y, Zhimin Z, Qing L, Zhu WG, Wu M. Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:2046-55.
123. Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J Biol Chem* 2004; 279:51082-90.
124. Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Kollermann J, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance. *Int J Cancer* 2007; 120:1081-6.
125. Hu S, Yang X. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 2003; 278:10055-60.
126. Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, Kobayashi Y, Sasaki H, Yano M, Fukai I, Fujii Y. Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep* 2004; 11:797-802.
127. Srinivasan R, Linehan WM. Targeted for destruction: the molecular basis for development of novel therapeutic strategies in renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:410-2.
128. Wu H, Tschopp J, Lin SC. Smac mimetics and TNFalpha: a dangerous liaison? *Cell* 2007; 131:655-8.
129. Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001; 3:128-33.
130. Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Vyas K, Reheman M, Tamai K, Toji S, Borden EC. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277:28504-11.

131. Xia Y, Novak R, Lewis J, Duckett CS, Phillips AC. Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. *Mol Cell Biochem* 2006; 286:67-76.
132. Arora V, Cheung HH, Plenchette S, Micali OC, Liston P, Korneluk RG. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* 2007; 282:26202-9.
133. Lee MG, Huh JS, Chung SK, Lee JH, Byun DS, Ryu BK, Kang MJ, Chae KS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG. Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene* 2006; 25:5807-22.
134. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 2000; 70:113-22.
135. Ma TL, Ni PH, Zhong J, Tan JH, Qiao MM, Jiang SH. Low expression of XIAP-associated factor 1 in human colorectal cancers. *Chin J Dig Dis* 2005; 6:10-4.
136. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Kang MJ, Kim HR, Chi SG. Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003; 63:7068-75.
137. Ng KC, Campos EI, Martinka M, Li G. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 123:1127-34.
138. Jang JY, Kim HJ, Chi SG, Lee KY, Nam KD, Kim NH, Lee SK, Joo KR, Dong SH, Kim BH, Chang YW, Lee JI, Chang R. [Frequent epigenetic inactivation of XAF1 by promoter hypermethylation in human colon cancers]. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45:285-93.
139. Chung SK, Lee MG, Ryu BK, Lee JH, Han J, Byun DS, Chae KS, Lee KY, Jang JY, Kim HJ, Chi SG. Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses. *Gastroenterology* 2007; 132:2459-77.
140. Zou B, Chim CS, Zeng H, Leung SY, Yang Y, Tu SP, Lin MC, Wang J, He H, Jiang SH, Sun YW, Yu LF, Yuen ST, Kung HF, Wong BC. Correlation Between the Single-Site CpG and Expression Silencing of the XAF1 Gene in Human Gastric and Colon Cancers. *Gastroenterology* 2006.
141. Shibata T, Noguchi T, Takeno S, Gabbert HE, Ramp U, Kawahara K. Disturbed XIAP and XAF1 Expression Balance Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2008.
142. Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, Leaman DW, Lindner D, Beaulieu N, MacLeod AR, Borden EC. Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation. *J Clin Oncol* 2006; 24:3771-9.
143. Motzer RJ, Murphy BA, Bacik J, Schwartz LH, Nanus DM, Mariani T, Loehrer P, Wilding G, Fairclough DL, Cella D, Mazumdar M. Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18:2972-80.
144. Minasian LM, Motzer RJ, Gluck L, Mazumdar M, Vlamis V, Krown SE. Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11:1368-75.
145. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi

- I, Jagiello-Grusfeld A, Moore N. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007; 370:2103-11.
146. Qi R, Gu J, Zhang Z, Yang K, Li B, Fan J, Wang C, He Z, Qiao L, Lin Z, Liu XY. Potent antitumor efficacy of XAF1 delivered by conditionally replicative adenovirus vector via caspase-independent apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2007; 14:82-90.
147. Rini BI. Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2006; 16:332-6.
148. Gelb AB. Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80:981-6.
149. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol* 2000; 163:1090-5; quiz 295.
150. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, Gitlitz BJ, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19:1649-57.
151. Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:802-11.
152. Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y, Horvath S, Stanbridge EJ, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171:2461-6.
153. Qi S, Mogi S, Tsuda H, Tanaka Y, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Hasegawa S, Omura K. Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37:1047-53.
154. Sato A, Oya M, Ito K, Mizuno R, Horiguchi Y, Umezawa K, Hayakawa M, Murai M. Survivin associates with cell proliferation in renal cancer cells: regulation of survivin expression by insulin-like growth factor-1, interferon-gamma and a novel NF-kappaB inhibitor. *Int J Oncol* 2006; 28:841-6.
155. Bilim V, Yuuki K, Itoi T, Muto A, Kato T, Nagaoka A, Motoyama T, Tomita Y. Double inhibition of XIAP and Bcl-2 axis is beneficial for retrieving sensitivity of renal cell cancer to apoptosis. *Br J Cancer* 2008; 98:941-9.
156. Van Poppel H, Joniau S, Van Gool SW. Vaccine Therapy in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2009.
157. Pinho MB, Costas F, Sellos J, Dienstmann R, Andrade PB, Herchenhorn D, Peixoto FA, Santos VO, Small IA, Guimaraes DP, Ferreira CG. XAF1 mRNA expression improves progression-free and overall survival for patients with advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Urol Oncol* 2008.

8. Danksagungen

Prof. Dr. Kurt Miller, für Möglichkeit zur Habilitation und die Freistellung vom klinischen Alltag während meiner Forschungsaktivitäten im urologischen Labor.

PD Dr. Steffen Weikert und Prof. Dr. Mark Schrader, für die langjährige freundschaftliche Betreuung meiner wissenschaftlichen Projekte und die vielen wertvollen Ratschläge.

Dr. rer. nat. Hans Krause, für das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten und Denken sowie für seine stets geduldige Unterstützung beim Design der optimalen PCR-Primer.

PD Dr. Frank Christoph, für die Einführung in den Forschungsbereich der Promotormethylierung und die konstruktive Zusammenarbeit.

Dr. Stefan Hinz und Dr. Ahmed Magheli für unsere Freundschaft und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Frau Waltraud Jekabsons und Frau Petra von Kwiatkowski, für die stets engagierte und zuverlässige medizinisch technische Assistenz im Rahmen aller praktischen Forschungsprojekte.

Allen Kolleginnen und Kollegen, für das Freihalten meines Rückens von der klinischen Routine während meiner praktischen Arbeiten im Labor.

Meiner Familie und meinen Freunden, für die schönen gemeinsamen Stunden nach getaner Arbeit und für das entgegengebrachte Verständnis, wenn ich mal wieder keine Zeit hatte.

Meiner Frau Anika, für Alles!

9. Eidesstattliche Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, Dr. med. Carsten Kempkensteffen geb. am 07.11.1973 in Lippstadt, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern / Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum / Unterschrift