

1 Einleitung

Im Bereich der urologischen Tumore ist insbesondere das metastasierte Nierenzellkarzinom durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet. Mit einem Anteil von 2% an allen malignen Tumoren ist das Nierenzellkarzinom zwar relativ selten, dennoch erkranken in Deutschland ca. 4-8 von 100.000 Menschen jährlich neu an diesem Tumor (Fischer und Oberneder, 2001). Damit ist in Deutschland mit mehr als 11.000 neuen Patienten jährlich zu rechnen. Weltweit nimmt die Inzidenz zu.

Da für das Nierenzellkarzinom keine Frühsymptome spezifisch sind, 60% der Tumorträger sind asymptomatisch, wird es oft als Zufallsbefund im Rahmen orientierender Oberbauchsonographien entdeckt (Hallscheidt, 2001). Dies hat unter anderem wegen der weiten Verbreitung der Sonographie indirekt zur Folge, dass der Anteil kleiner gut behandelbarer Tumore in den letzten Jahren stetig zunimmt. Allerdings stellen sich etwa 30% der Patienten initial mit bereits metastasierten Tumoren vor. Dabei ist der entscheidende Faktor für die Prognose des Nierenzellkarzinoms das Vorliegen von Metastasen. Ist es bereits zu einer Metastasierung gekommen, so beträgt gegenwärtig die mittlere Überlebenszeit weniger als ein Jahr (Fischer und Oberneder, 2001).

Die Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms erweist sich als ausgesprochen diffizil. In diversen klinischen Studien ist gezeigt worden, dass Hormon- und Chemotherapie keinen Vorteil für den Patienten haben (Martel und Lara, 2003). Auch sind die Therapieerfolge bei der gegenwärtig als Mittel der Wahl geltenden Immuntherapie eher bescheiden. Verschiedene Studien, in denen Interferon- α verwendet worden ist, haben Ansprechraten von 10-15% erzielt. Dabei haben die Nebenwirkungen bei 20-40% der Patienten zu einer Dosisreduktion oder zu einer Unterbrechung der Interferontherapie geführt (Martel und Lara, 2003). Die Ansprechraten für Interleukin-2 haben in diversen Studien ebenfalls bei 15% gelegen (Fisher *et al.*, 2000). Auch eine Kombination von Interleukin-2 und Interferon- α hat keine Verbesserung bei der Ansprechraten erzielt (Martel und Lara, 2003). Allerdings konnte die Kombination eine Senkung der Nebenwirkungen erreichen. Derzeit sind neue Substanzen aus der Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren wie zum Beispiel Sunitinib und Sorafenib in breiter klinischer Erprobung. Erste ermutigende Ergebnisse wurden bereits vorgestellt (Motzer *et al.*, 2006b; Ratain *et al.*, 2006).

Als Ursache für diese niedrigen Ansprechraten werden eine primäre Multi-drug-Resistenz (Oudard *et al.*, 2002), verschiedene immunologische Mechanismen (Dovhey *et al.*, 2000) und

Defekte in den apoptosevermittelnden Signaltransduktionskaskaden (Hetts, 1998) verantwortlich gemacht.

Da die gegenwärtigen Therapieoptionen nur gering wirksam sind, ist es erforderlich, neue Strategien in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zu entwickeln. Zudem macht die ansteigende Inzidenz deutlich, dass das Nierenzellkarzinom in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnt und der Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten zunehmen wird. Einen der neuen Therapieansätze stellt die Gruppe der Histondeacetylaseinhibitoren (HDI) dar. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob HDIs in Nierenkarzinomzelllinien Apoptose induzieren und sie somit eine Therapieoption für die Zukunft sein können. HDIs haben bereits in einer Reihe von Tumoren, wie zum Beispiel Kolon-, Pankreas- und Endometriumkarzinomzelllinien, über eine Veränderung des Acetylierungsstatus der Histone Apoptose bzw. Wachstumsstopp induzieren können (Clarke *et al.*, 2001; Donadelli *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2004). Histonacetylierung und Histondeacetylierung spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression. Dabei ist die Histonacetylierung durch ein Zusammenspiel von Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) reguliert. Stark acetylierte Histone werden mit Transkription in Verbindung gebracht, dagegen werden gering acetylierte Histone in inaktiven Zellen gefunden (Marks *et al.*, 2001b). Da die Entstehung von Tumoren ganz allgemein als eine Veränderung im Genexpressionsmuster angesehen werden kann, liegt es nahe, Störungen der Homöostase von HATs und HDACs als einen weiteren kritischen Faktor bei der Tumorgenese zu bewerten (Mahlknecht und Hoelzer, 2000).

In verschiedenen Tumoren, zum Beispiel Leukämien, oder in Magenkarzinomzelllinien sind Gene, die für HATs kodieren, in charakteristischer Weise transloziert und/oder mutiert (Fenrick und Hiebert, 1998; Gayther *et al.*, 2000). Auf der anderen Seite ist in unterschiedlichen Leukämie- und Lymphomarten eine verstärkte Aktivität von HDACs beobachtet worden (Pandolfi, 2001). Durch diese gestörte Homöostase zwischen HATs und HDACs kann es unter anderem zu einer Deregulation von Genen, die an der Regulation von Apoptose, des Zellzyklus und der Differenzierung beteiligt sind, kommen.

Die neue Substanzklasse der HDIs, die einen direkten Einfluss auf die Wirkung auf HATs und HDACs haben, ist eine chemisch nicht einheitliche Gruppe. Unter anderem besteht sie aus kurz kettigen Fettsäuren (zum Beispiel Butyrat, Valproat), Hydroxamidsäuren (zum Beispiel TSA), zyklischen Tetrapeptiden, die eine 2-amino-8-oxo-9,10-epoxy-decanoyl Gruppe enthalten (zum Beispiel Trapoxin A), zyklischen Peptiden, die keine a 2-amino-8-oxo-9,10-epoxy-decanoyl Gruppe enthalten (zum Beispiel Apicidin), und Benzamiden (zum Beispiel MS-275) (Marks *et al.*, 2001b).

Ganz allgemein induzieren HDIs unter anderem eine Hyperacetylierung der Histone, die in der Folge zur Transkription von Genen führt, von denen einige wiederum für Aktivierung der Apoptose und/oder Differenzierung in Tumorzellen verantwortlich sind. Außerdem ist gezeigt worden, dass HDIs bei einer großen Anzahl von Genen eine Hemmung der Genexpression bewirken. Dabei lag die Anzahl der supprimierten Gene in der gleichen Größenordnung wie die Zahl der durch HDIs stimulierten Gene (Glaser *et al.*, 2003). Während die Induktion der Genexpression durch HDIs überzeugend durch das Modell der Histonacetylierung veranschaulicht wird (Cress und Seto, 2000), ist der Mechanismus der Gensuppression durch HDIs weniger gut charakterisiert.

Obwohl die HDIs in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Studien gewesen sind, ist ihr genauer Wirkmechanismus bis heute nicht geklärt.

Eine wesentliche Eigenschaft von neoplastischen Zellen ist ihr unkontrolliertes Wachstum (Hetts, 1998). Dagegen ist die homöostatische Kontrolle der Zellzahl gutartiger Zellpopulationen das Resultat einer dynamischen Balance zwischen Zellproliferation und dem programmierten Zelltod. Unter nicht physiologischen Bedingungen sterben Zellen in der Regel durch Nekrose. Ein „kontrolliertes“ Absterben, d. h. ein programmierter Zelltod wird dagegen durch Apoptose erreicht. Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der es dem Organismus erlaubt, auf veränderte Lebensbedingungen zu reagieren. Apoptose wird zum Beispiel im Rahmen der Embryogenese aktiviert, um ein unkontrolliertes Wachstum des Gewebes zu verhindern. Des Weiteren werden Zellen, die ein bestimmtes Alter erreicht haben, durch Apoptose eliminiert (Hetts, 1998). Heute wird allgemein davon ausgegangen, dass Krebs unter anderem durch eine unkontrollierte Proliferation von Zellen charakterisiert ist, die wiederum auf einer Störung des apoptotischen Gleichgewichts basiert (Green und Evan, 2002). Umfangreiche Forschungen zur Regulation der Apoptose *in vivo* und *in vitro* lassen generell den Rückschluss zu, dass Therapien, die als Ansatzpunkt die gestörten apoptotischen Signaltransduktionswege haben, das Tumorstadium hemmen oder sogar die Tumorstadiumgröße reduzieren können (Zornig *et al.*, 2001). Des Weiteren ist eine funktionierende Apoptosekaskade relevant für ein Ansprechen auf Strahlen- und konventionelle Chemotherapie in der Behandlung von Tumoren. So werden Mutationen in Genen, die direkt oder indirekt zu einem Verlust der Apoptosefähigkeit führen, für einen geringen Behandlungserfolg und damit für eine schlechte Prognose verantwortlich gemacht (Hetts, 1998).

Auf der molekularen Ebene ist die Apoptose ein sehr komplexer und bis heute noch nicht in allen Einzelheiten geklärt Prozess. Apoptose kann auf verschiedenen Wegen induziert werden (Abbildung 1). Der so genannte „Todesrezeptor-Weg“ (death receptor), zu dem unter anderem

die Rezeptoren Fas und Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-Rezeptor) gezählt werden, wird durch die Fas-Liganden (FasL) oder Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) aktiviert. Der FasL/Fas-Komplex rekrutiert über das Adaptermolekül Fas-associated death domain protein (FADD) eine Reihe von Caspase-Molekülen, die sogenannten Procaspase-8-Proteine, die dann durch Autokatalyse zu Caspase-8 aktiviert werden. Caspase-8 spaltet zum einen Procaspase-3 zur aktiven Caspase-3, zum anderen aktiviert sie Bid, das die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien stimuliert. Cytochrom C aktiviert nun in einem Komplex mit Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) Caspase-9. Die Verbindung aus Cytochrom C, Apaf-1 und Caspase-9, die als Apoptosom bezeichnet wird, aktiviert nun Caspase-3 (Hengartner, 2000).

Für die Degradation der zellulären Proteine spielen Caspasen eine zentrale Rolle. Caspasen gehören zur Gruppe der Cysteinproteasen. Sie können andere Proteine durch Spaltung aktivieren, wie zum Beispiel Endonukleasen, die für die DNA-Fragmentierung verantwortlich sind. Darüber hinaus zerstören sie unter anderem auch DNA-Reparationsenzyme, wie zum Beispiel die Polyadenosindiphosphat-Ribosepolymerase.

In dem anderen Hauptweg, der zur Apoptose führt, nehmen die Mitochondrien eine zentrale Funktion ein. Durch extrazelluläre Signale oder intrazelluläre Veränderungen, wie zum Beispiel Schäden an der DNA, wird die Kaskade aktiviert. So führen DNA-Schäden über das p53 zur Aktivierung der proapoptotischen Fraktion der Bcl-2 Familie. Dies hat zur Folge, dass Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird und Caspase-9 und Caspase-3 aktiviert werden.

Die Todesrezeptor-Signaltransduktionskaskade und die Mitochondrien-Signaltransduktionskaskade haben als gemeinsamen Endpunkt die Aktivierung der Caspase-3.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die die Apoptose reguliert, ist die Bcl-2 Familie. Ihr Name stammt von B-cell lymphoma, in dem sie zum ersten Mal isoliert wurde. Die Bcl-2 Familie wird in drei Gruppen unterteilt: Gruppe I (Bcl-2, Bcl-x_L) hemmt die Apoptose, Gruppe II (Bax, Bak) und Gruppe III (Bid, Bik) induzieren Apoptose. Sie sind in der mitochondrialen Membran lokalisiert. Im normalen Zustand der Zelle besteht ein Gleichgewicht zwischen der proapoptotischen und der antiapoptotischen Fraktion. Überwiegt die proapoptotische Fraktion, so ist die Zelle sensitiver für den Zelltod. Die Hauptaufgabe der Bcl-2 Familie besteht darin, die Freisetzung von apoptoseinduzierenden Faktoren, wie zum Beispiel Cytochrom C, das Caspase-9 aktiviert, aus den Mitochondrien zu regulieren (Hetts, 1998).

Zu einer dritten Gruppe von Proteinen, die die Apoptose reguliert, gehört die Familie der Inhibitors of apoptosis proteins (IAP). Sie hemmen die Caspasen und verhindern einen nicht beabsichtigten Tod der Zelle (LaCasse *et al.*, 1998). Die IAPs können auf physiologischem

Wege durch Faktoren, die ebenfalls aus den Mitochondrien stammen, gehemmt werden. Am bekanntesten ist der Smac/DIABLO Komplex (Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI), der die IAPs hemmt und so verhindert, dass die Apoptose gestoppt wird.

Zu der Familie der IAPs gehört unter anderem das 1997 entdeckte Survivin (Ambrosini *et al.*, 1997). In der hier vorliegenden Arbeit werden die Genexpression von Survivin in Nierenkarzinomzellen, in denen Apoptose experimentell induziert worden ist, mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und das Genexpressionsmuster analysiert. Survivin ist ein Protein, das Apoptose hemmt und den Zellzyklus reguliert (LaCasse *et al.*, 1998). Es ist in den meisten Tumorgeweben und in embryonalen Stammzellen nachweisbar (Chiou *et al.*, 2003) und gehört in Tumoren zu den vier am stärksten exprimierten Genen (Velculescu *et al.*, 1999). Dagegen kann es in normalen differenzierten adulten Zellen nicht nachgewiesen werden. Zudem wird Survivin für das beschleunigte Auftreten von Rezidiven (Blanc-Brude *et al.*, 2003) und für die Chemoresistenz von Tumoren mitverantwortlich gemacht (Mahotka *et al.*, 1999). Die oben genannten Eigenschaften des Survivin machen es als ein neues Zielmolekül in der Behandlung von Tumoren interessant (Altieri, 2003).

Wie bereits oben erwähnt, haben Todesrezeptor-Signaltransduktionskaskade und die Mitochondrien-Signaltransduktionskaskade als gemeinsame Endstrecke die Aktivierung der Caspase-3 (Hengartner, 2000). Aufgrund der exponierten Stellung der Caspase-3 wird sie als ein Marker für apoptotische Prozesse in Zellen angesehen. Die inaktive Prokaspase-3 wird durch eine Reihe von Caspasen, die auch Initiator-Caspasen genannt werden, zur aktiven Caspase-3 gespalten. Sie gehört zu den Effektor-Caspasen, weil sie unter anderem Bestandteile des Zytoskeletts und nukleäre Proteine zerstört. In der vorliegenden Arbeit ist die Caspase-3-Expression per RT-PCR und Western Blotting als Indikator für erfolgreiche Apoptoseinduktion gemessen worden.

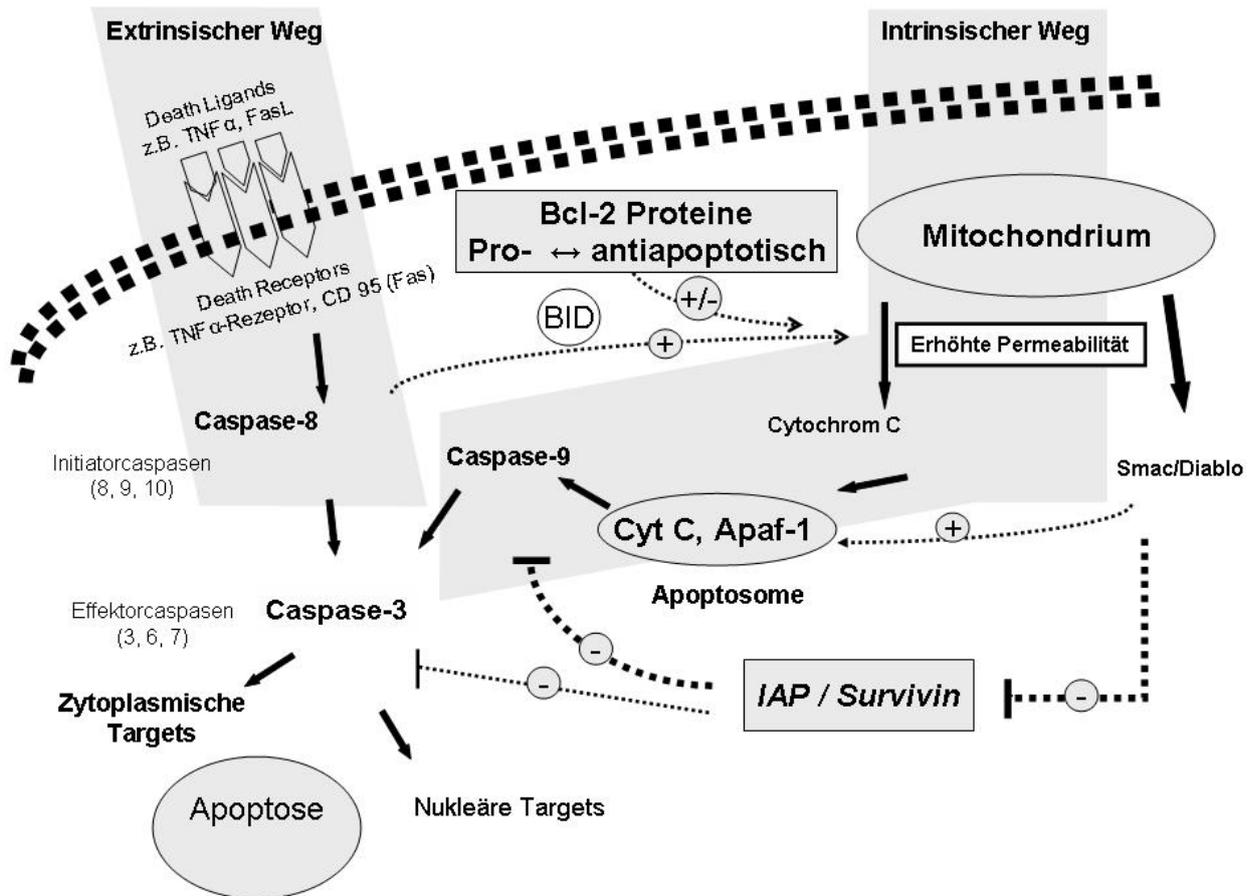


Abbildung 1. Darstellung der unterschiedlichen Signaltransduktionswege der Apoptose.

→: Aktivierung
 —|: Inhibierung

Die vorliegende Arbeit untersucht Möglichkeiten der Apoptoseinduktion durch HDI-Behandlung in Nierenkarzinomzelllinien als ein Modell für das metastasierte Nierenzellkarzinom. Speziell werden die konzentrations- bzw. zeitabhängigen Wirkungen der HDIs Butyrat, Valproat und Trichostatin A auf die Zelllinien SN12, A498 und ACHN untersucht.

Dabei wird auf molekularer Ebene der Effekt der HDI Behandlung auf apoptoserelevante Gene untersucht. Dafür werden die Caspase-3- und die Survivin-Genexpression analysiert. Insbesondere sollen folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Können die Histondeacetylaseinhibitoren Butyrat, Valproat und Trichostatin A Apoptose in Nierenkarzinomzelllinien induzieren?
2. Ist die proapoptotische Wirkung der Histondeacetylaseinhibitoren mit einer Steigerung der Caspase-3-Genexpression assoziiert?
3. Gibt es eine Assoziation zwischen der Wirkung von HDIs und der Expression des antiapoptotischen Moleküls Survivin?