Aus der Urologischen Klinik der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expressionsprofil und prognostische Bedeutung der mitochondrialen IAP Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 im klarzelligen Nierenzellkarzinom

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Karen Kadner
aus Dresden

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. St. Weikert

2. Priv.-Doz. Dr. med. A. Schmittel

3. Prof. Dr. med. J. Roigas

Datum der Promotion: 19.03.2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	10
	1.1 Epidemiologie	10
	1.2 Ätiologie	11
	1.2.1 Risikofaktoren	11
	1.2.2 Genetische Aspekte	11
	1.2.3 Molekulare Mechanismen bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms	11
	1.3 Histopathologische Einteilung des Nierenzellkarzinoms	12
	1.4 Therapieansätze	13
	1.4.1 Operative Therapie	13
	1.4.2 Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome	14
	1.5 Prognosefaktoren	15
	1.6 Apoptoseregulation	16
	1.7 Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs)	18
	1.8 IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2	19
	1.9 Zielstellung	23
2	Material und Methoden	24
	2.1 Gewinnung und Aufarbeitung der Präparate	24
	2.1.1 Asservierung der Proben	24
	2.1.2 Aufbereitung der Proben	25

	2.1.3	RNA-Extraktion	26
	2.1.4	Real-time RT-PCR	26
	2.1.4	4.1 Erstellung der Standardkurven	27
	2.1.4	4.2 Bestimmung der relativen Genexpression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in den	
		Tumorproben	31
	2.2 Date	enauswertung und Statistik	32
	2.3 Mat	erialien	34
	2.3.1	Reagenzien und Chemikalien	34
	2.3.2	Geräte und Hilfsmittel	35
	2.3.3	Primer und Hybridisierungsproben	36
	2.3.3	3.1 Omi/HtrA2	36
	2.3.3	3.2 Smac/DIABLO	36
3	J	sse rakteristika der Studienpopulation	
	3.2 mR	NA-Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in klarzelligen Nierenkarzinomer	37
	3.2.1	Korrelation der Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit klinischen und	
		pathologischen Parametern	37
	3.2.2	Korrelation der Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit der Prognose	41
4	Diskuss	ion	48
5	Zusamr	nenfassung	57
6	Literatu	rverzeichnis	59
Da	ank		
Le	ebenslauf		

Erklärung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Apoptose	17
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Regulation von Smac/DIABLO durch IAPs	.20
Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Interaktion von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mden IAPs.	
Abb. 4: Standardkurve für Smac/DIABLO	.30
Abb. 5: Standardkurve für Omi/HtrA2	.30
Abb. 6: Deskriptive Statistik für die normalisierte Expression von Smac/DIABLO in klarzelligen Nierenzellkarzinomproben.	.38
Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie	.42
Abb. 8: Kaplan-Meier-Kurve für das tumorspezifische Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie	.43
Abb. 9: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie	44
Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurve für das tumorspezifische Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornenhrektomie	45

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation der Patienten nach histopathologischen Gesichtspunkten	25
Tab. 2: Protokoll cDNA-Synthese aus der isolierten Gesamt-RNA der HeLa Zelllinie2	28
Tab. 3: PCR-Protokoll für die Erstellung der Standardkurven	29
Tab. 4: Pipettierschema für die Bestimmung der relativen Genexpression der Zielgene auf dem <i>LightCycler</i> ®	
Tab. 5: PCR-Protokoll für die Bestimmung der relativen Genexpression der Zielgene a dem <i>LightCycler</i> [®]	
Tab. 6: Reagenzien und Chemikalien	34
Tab. 7: Geräte und Hilfsmittel	35
Tab. 8: Primer und Hybridisierungssonden Omi/HtrA2	36
Tab. 9: Primer und Hybridisierungssonden Smac/DIABLO	36
Tab. 10: Korrelation der relativen Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2	
Tab. 11: Uni- und multivariate Cox-Regression (mit Vorwärtsselektion) für Rezidive un tumorbedingten Tod bei Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom im Anschluss an chirurgische Intervention	

Abkürzungsverzeichnis

ACTB ß-Actin

ANOVA Analysis of variance

APAF1 Apoptotic protease activating factor-1

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

BID BH3 interacting domain death agonist

BIR Baculoviral IAP Repeat

°C Grad Celsius

CAIX Carboanhydrase IX

Caspase Cystein aspartate-specific proteases cDNA complementary Deoxyribonucleic acid

CI Confidence Interval cIAP-1/-2 celluläres IAP-1/-2

cm Centimeter CO₂ Kohlendioxid

CT Computertomographie

dATP 2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat

DEPC Diethylpyrocarbonat

DNA Deoxyribonucleic acid

dNTP 2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat

DTT Dithiothreitol

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

E2F1 E2F transcription factor 1
FLT-3 Fms-like tyrosine kinase 3

FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer

g Gramm

G Grading (Differenzierungsgrad)

G Erdbeschleunigung

GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

h Stunden

HE Hämatoxylin-Eosin HeLa Henrietta Lacks

HIF Hypoxie-Induzierter Faktor

HIV Humanes Immundefizienz-Virus

h-PBGD humane Porphobilinogen-Desaminase

IAP Inhibitor of Apoptosis Protein

ILP-2 IAP-Like Protein 2

KIT Stem cell factor receptor

I Liter
M Median

M Metastasen

M molar

mM millimolar

MEM Minimum Essential Medium

mg Milligramm

MgCl₂ Magnesiumchlorid

min Minuten ml Milliliter

mRNA messenger Ribonucleic acid
MRT Magnetresonanztomographie

mTOR mammalian Target Of Rapamycin

μg Mikrogramm
μl Mikroliter
μm Mikrometer

n Anzahl

n.a. not available

NAIP Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein

NEA Nicht Essentielle Aminosäure

ng Nanogramm

NZK Nierenzellkarzinom

Omi/HtrA2 Omi/High temperature requirement protein A2

p Signifikanzniveau

PBS Phosphate Buffered Saline

PDGF Platelet-Derived Growth Factor

PDGF-R Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PPIA Peptidylprolylisomerase A

pT pathologisch gesichertes Tumorstadium

PTEN Phosphatase and Tensin homolog

RAF Rapidly growing fibrosarcoma

RES Resveratrol

RIN RNA Integrity Number

RNA Ribonucleic acid rpm rounds per minute

RT-PCR Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction

s Sekunden

Smac/DIABLO Second mitochondria-derived activator of caspases/

Direct IAP binding protein with low pl

T Tumor (Primärtumor)

tBID truncated BH3 interacting domain death agonist

TBP TATA Box-bindendes Protein

TNF Tumor-Nekrose-Faktor

TNM Tumor Nodes Metastasen

UICC Union Internationale Contre le Cancer

UV Ultraviolett

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL von-Hippel-Lindau

XAF1 X-Linked Inhibitor of Apoptosis - Associated Factor-1

XIAP X-Linked Inhibitor of Apoptosis

 χ^2 Chi-Quadrat

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Mit einem Anteil von 4,7% an allen malignen Neoplasien in Deutschland stellt das Nierenzellkarzinom (NZK) eine vergleichsweise seltene Tumorentität dar [Gupta et al. 2008, Schlesinger-Raab et al. 2008]. Global betrachtet ist die Inzidenz in Nordamerika und dem nördlichen Europa am höchsten, während Nierenzellkarzinome in Asien, Zentral- und Südamerika deutlich seltener auftreten [Martel und Lara 2003, Rini et al. 2008]. Im europaweiten Vergleich liegt Deutschland hinsichtlich der Inzidenz an der Spitze [Gupta et al. 2008]. Nach Prostata- und Blasenkarzinomen ist das Nierenzellkarzinom der dritthäufigste urologische Tumor, weist mit 40% jedoch die höchste tumorspezifische Mortalität urologischer Neoplasien auf [Pascual und Borque 2008]. Nierenzellkarzinome werden am Häufigsten um das sechzigste Lebensjahr diagnostiziert, wobei ca. 80% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 40 und 69 Jahre alt sind [Pascual und Borque 2008]. Männer Nierenzellkarzinomen etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen [Lipworth et al. 2006, Gupta et al. 2008]. Für Männer ist es der achthäufigste maligne Tumor, bei Frauen der neunthäufigste [Ferlay et al. 2007]. Die Anzahl der diagnostizierten Neuerkrankungen nimmt jährlich um 1,5-5,9% zu bzw. ist seit 1950 um 126% angestiegen [Gupta et al. 2008]. Diese Zunahme der Inzidenz ist größtenteils auf den verstärkten Einsatz bildgebender Verfahren wie Ultraschall, Computertomographie (CT) Magnetresonanztomographie (MRT) im Rahmen von Routineuntersuchungen zurückzuführen [Martel und Lara 2003, Schlesinger-Raab et al. 2008]. Betrug der Anteil der zufällig diagnostizierten Nierentumoren in den frühen 1970ern nur ca. 10%, wurden in der letzten Dekade des vorigen Jahrhunderts bereits etwa 60% der Nierentumoren nebenbefundlich entdeckt [Ng et al. 2008]. Dennoch ist die Steigerung der Inzidenz durch eine verbesserte und frühere Diagnostik allein nicht ausreichend erklärt. Eine erhöhte Prävalenz wichtiger Risikofaktoren wird deshalb als zusätzliche Ursache für die steigenden Inzidenzraten diskutiert [Gupta et al. 2008].

1.2 Ätiologie

1.2.1 Risikofaktoren

Nachgewiesene Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierentumors sind Rauchen, Übergewicht, insbesondere bei Frauen, und Bluthochdruck bzw. dessen medikamentöse Therapie [Moore et al. 2005, Lipworth et al. 2006, Gupta et al. 2008, Pascual und Borque 2008, Rini et al. 2008, Rini et al. 2009]. Eine erhöhte Inzidenz besteht darüber hinaus bei Diabetes mellitus, HIV-Infektion und nach Langzeit-Hämodialyse [Gupta et al. 2008, Pascual und Borque 2008]. Potentielle Risikofaktoren wie Schmerzmittel- und Alkoholabusus, eiweißreiche Ernährung, Asbest-, Kadmiumund Strahlenexposition werden kontrovers diskutiert [Lipworth et al. 2006, Pascual und Borque 2008].

1.2.2 Genetische Aspekte

Etwa 10% der Nierenzellkarzinome entstehen aufgrund genetischer Defekte, wobei das autosomal-dominant vererbte von-Hippel-Lindau- (VHL) Syndrom als häufigste Ursache gilt [Jost 2003]. Eine Mutation des VHL-Tumorsuppressorgens auf dem Chromosom 3p resultiert in einer Prädisposition zur Ausbildung hochvaskularisierter neurologischer (Haemangioblastom des Zentralnervensystems, Angiom der Retina) und adrenaler (Phaeochromozytom) Tumoren. Häufig kommt es zur Beteiligung des Pankreas, wobei es sich bei der Mehrzahl der Läsionen um Zysten und zu 5-17% um neuroendokrine Tumoren handelt [Alexakis *et al.* 2004]. Klarzellige Nierenzellkarzinome manifestieren sich bei ca. 40-60% der VHL-Patienten [Martel und Lara 2003, Pascual und Borque 2008].

1.2.3 Molekulare Mechanismen bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms

Eine Fehlregulation des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) führt zur Überexpression von Faktoren wie VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und PDGF (*Platelet-derived growth factor*) [Rini 2005, Crispen *et al.* 2008, Kapitsinou und Haase 2008, Semenza 2008]. Die daraus resultierende Angiogenese ist in einer Vielzahl maligner Neoplasien als Resultat genetischer Alterationen und intratumoraler Hypoxie gesteigert [Semenza 2008].

Dies wurde insbesondere im Zusammenhang mit dem Verlust der VHL-Funktion im klarzelligen Nierenzellkarzinom ausführlich beschrieben [Rini und Rathmell 2007, Kapitsinou und Haase 2008, Semenza 2008].

Des Weiteren können Störungen im mTOR-Signaltransduktionsweg (*mammalian Target of Rapamycin*) für die Tumorgenese des Nierenzellkarzinoms von Bedeutung sein, da mTOR maßgeblich an der Regulation von Proliferation und Wachstum sowohl gesunder als auch maligner Zellen beteiligt ist [Dancey 2006].

1.3 Histopathologische Einteilung des Nierenzellkarzinoms

Nierenzellkarzinome machen ca. 90-95% aller Neoplasien der Niere aus und werden, in Übereinstimmung mit der Heidelberger Klassifikation, in folgende fünf Subtypen unterteilt: klarzellig (70-80%), papillär (10-15%), chromophob (5%), Karzinome vom Bellini-Typ (<1%) und die nicht klassifizierbaren Nierenzellkarzinome (7%) [Cohen *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2009, Gupta *et al.* 2008, Martel und Lara 2003, Mancini *et al.* 2008, Ng *et al.* 2008]. Während das klarzellige Nierenzellkarzinom dem proximalen Tubulusepithel und der papilläre Subtyp dem distalen Tubulusepithel entstammen, gehen Tumoren vom Bellini-Typ und das chromophobe Nierenzellkarzinom aus dem Sammelrohrsystem hervor [Martel und Lara 2003].

Die sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome treten typischerweise unilateral und unifokal auf, während bei der hereditären Form mit Multifokalität gerechnet werden muss [Martel und Lara 2003, Ng *et al.* 2008]. Eine funktionelle Inaktivierung des VHL-Tumorsuppressorgens ist in 100% der hereditären und 57% der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome nachgewiesen worden und kann durch eine genomische Mutation (50-80%), Deletion (60-80%) oder eine abnorme DNA-Methylierung (20-25%) bedingt sein [Cheng *et al.* 2009].

Differentialdiagnostisch müssen Nierenzellkarzinome gegenüber Nierenzysten, Onkozytomen, Urothelkarzinomen des Nierenbeckenkelchsystems, aber auch Adenomen, Angiomyolipomen, Nephroblastomen, Sarkomen, Lymphomen und Metastasen anderer Tumoren abgegrenzt werden [Jost 2003, Martel und Lara 2003, Cheng *et al.* 2009].

1.4 Therapieansätze

1.4.1 Operative Therapie

Die chirurgische Therapie ist die einzige kurative Behandlungsmethode für das lokalisierte Nierenzellkarzinom [Janzen et al. 2003]. Die 1963 durch Robson eingeführte radikale Nephrektomie [Robson 1963] schließt die Entfernung der betroffenen Niere inklusive der Gerota'schen Faszie, der ipsilateralen Nebenniere, sowie der paracavalen bzw. paraaortalen Lymphknoten ein [Martel und Lara 2003, Tomita 2006]. Die Adrenalektomie und Lymphadenektomie werden heute allerdings nicht mehr standardmäßig empfohlen, da die Prognose dadurch nicht wesentlich verbessert wird [Martel und Lara 2003].

Bei Tumoren mit einem Durchmesser ≤ 4cm und normaler Funktion der kontralateralen Nierenteilresektion oder durch eine Tumorenukleation organerhaltend operiert werden [Peycelon et al. 2009]. Imperative Indikationen für eine Nierenteilresektion sind beidseitiger Tumorbefall, das Vorhandensein anatomischen oder funktionellen Einzelniere und eine vorbestehende Niereninsuffizienz [Peycelon et al. 2009, Rini et al. 2009]. Obwohl die Nierenteilresektion ein gewisses Risiko für die Entstehung eines Lokalrezidivs bzw. eine mögliche Metastasierung birgt, entsprechen die onkologischen Resultate der organerhaltenden Operation im Wesentlichen denen der radikalen Nephrektomie [Tomita 2006, Peycelon et al. 2009]. Sowohl die radikale als auch partielle Nephrektomie können offen chirurgisch oder laparoskopisch durchgeführt werden [Tomita 2006].

Für multifokale, periphere Läsionen stehen des Weiteren Kryo- und Radiofrequenzablation als minimalinvasive Behandlungsoptionen zur Verfügung [Cohen et al. 2005, Rini et al. 2006]. Aufgrund der niedrigen Morbidität eignen sich diese besonders für ältere Patienten mit kleinen Tumoren [Rini et al. 2006]. Erste Ergebnisse scheinen viel versprechend, Langzeitstudien zur Thermoablation stehen allerdings noch aus, sodass diese Therapieoption gegenwärtig als experimentell zu betrachten ist [Gill et al. 2005, Levinson et al. 2008].

1.4.2 Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome

Bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen etwa ein Drittel der Nierenzellkarzinom-Patienten Metastasen auf [Rini *et al.* 2006]. Ein weiteres Drittel der Patienten, die aufgrund eines primär lokalisierten Nierenzellkarzinoms in kurativer Intention operiert werden, erleidet im Verlauf ein Rezidiv [Cohen *et al.* 2005]. Dabei sind Lokalrezidive mit ca. 5% wesentlich seltener als das sekundäre Auftreten von Metastasen [Motzer *et al.* 1996]. Im metastasierten Stadium beträgt das mediane Überleben betroffener Patienten nur ca. 12 Monate, die 5-Jahres Überlebensrate nicht wesentlich mehr als 10% [Gupta *et al.* 2008]. Dies ist vor allem auf das extrem schlechte Ansprechen des Nierenzellkarzinoms auf konventionelle Chemo- oder Strahlentherapien zurückzuführen [Janzen *et al.* 2003, Rini *et al.* 2009]. 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 [Coppin *et al.* 2005, Bellmunt und Guix 2009, Rini *et al.* 2009].

Erst ein zunehmendes Verständnis der in Nierenzellkarzinomzellen aktiven bzw. alterierten Signaltransduktionswege führte in den letzten Jahren zur Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien ("targeted-therapies") [Patard et al. 2008, Rini et al. 2009]. Verstärkte Aufmerksamkeit galt dabei den, typischerweise hochvaskularisierten, klarzelligen Nierenzellkarzinomen [Patard et al. 2008]. Der orale Inhibitor der VEGF-(Nexavar®), Sorafenib Rezeptortyrosinkinase und RAF-Kinase Multityrosinkinaseinhibitor (VEGFR, PDGFR, KIT, FLT-3) Sunitinib (Sutent®), der monklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) und der spezifische Inhibitor der mTOR-Kinase Temsirolimus (Torisel®) wurden für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms bereits zugelassen, nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Substanzen die Prognose der Patienten gegenüber dem bisherigen Therapiestandard Interferon-α signifikant verbessern konnten [Motzer et al. 2007, Ravaud et al. 2008, Rini et al. 2009].

1.5 Prognosefaktoren

Anbetracht dieser neuen Therapieoptionen bekommt die postoperative von Nierenzellkarzinompatienten einen zunehmend Tumornachsorge 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.

Derzeit etablierte prognostische Parameter gliedern sich vornehmlich in anatomische (z.B. TNM-Klassifikation), histologische (z.B. Differenzierungsgrad, Subtyp, Nachweis von Nekrosen), klinische (z.B. Leistungsindex nach Karnofsky und ECOG) und laborchemische (z.B. Serumlaktatdehydrogenase, Calcium- und Hämoglobin-Spiegel) Faktoren [Lam et al. 2005, Lee et al. 2006, Ljungberg 2007, Margulis et al. 2009]. 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 [Ljungberg 2007], von denen einige (z.B. Motzer-Score) nach erfolgreicher Validierung bereits Eingang in die klinische Routine gefunden haben [Tunuguntla et al. 2008].

Dennoch repräsentieren die einzelnen Variablen solcher Modelle prinzipiell nur die, sehr heterogenen Surrogatparameter für der Aggressivität von Nierenzellkarzinomen zu Grunde liegenden, molekularen Veränderungen im Tumor [Kosari et al. 2005]. Man geht deshalb davon aus, dass die Identifizierung und deren Inkorporation molekularer Parameter in integrierte Prognosemodelle Vorhersagegenauigkeit durch eine bessere Reflektion des individuellen Tumorverhaltens noch deutlich steigern wird [Lam et al. 2005]. Die Erforschung molekularer Faktoren, die potentiell eine Rolle in der Tumorbiologie des Nierenzellkarzinoms spielen, bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Mechanismen der Tumorgenese und -progression aufzuklären sowie neue therapeutische Ziele zu identifizieren [Parker et al. 2006].

Neben zahlreichen bereits untersuchten Faktoren wie CAIX (Carboanhydrase IX), B7-H1, p53, PTEN oder dem VHL-Gen-Mutationsstatus stellen möglicherweise auch Moleküle, die an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt sind, potenzielle molekulare Prognosefaktoren des Nierenzellkarzinoms dar.

1.6 Apoptoseregulation

Als programmierter Zelltod ist die Apoptose u.a. für die Embryogenese von entscheidender Bedeutung und bildet, mittels Eliminierung überflüssiger oder potenziell schädlicher Zellen, eine wichtige Grundlage für die Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase [Züllig und Hengartner 2004, Reed *et al.* 2004, Twomey und McCarthy 2005, Yan und Shi 2005].

Wie in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt, wird der Prozess der Apoptose hauptsächlich über zwei Signalwege initiiert: durch Aktivierung so genannter "death receptors" an der Zelloberfläche (extrinsisch) oder durch Schädigung der Mitochondrien und der daraus resultierenden Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie Cytochrom c in das Zytoplasma (intrinsisch) [Wang et al. 2005, Sun und Peng 2009]. Beide Signalwege resultieren in einer Aktivierung von Caspasen (Cystein aspartate-specific proteases), Proteasen, die den Zelltod auslösen [Wang et al. 2005]. Die Familie dieser insgesamt 14 intrazellulären Proteine kann hinsichtlich der Apoptose in zwei funktionelle Untergruppen eingeteilt werden: die Initiator-Caspasen 2, 8, 9, 10 und 12 ("upstream") und die von ihnen aktivierten Effektor-Caspasen 3, 6, 7 und 14 ("downstream") [Wang et al. 2004, Ho und Hawkins 2005, Twomey und McCarthy 2005, Wang et al. 2005, Yan und Shi 2005]. Diese sind für das Stoppen des Zellzyklus, die Inaktivierung der DNA-Reparatur und das Zerlegen des Zytoskelettes verantwortlich [Wang et al. 2005].

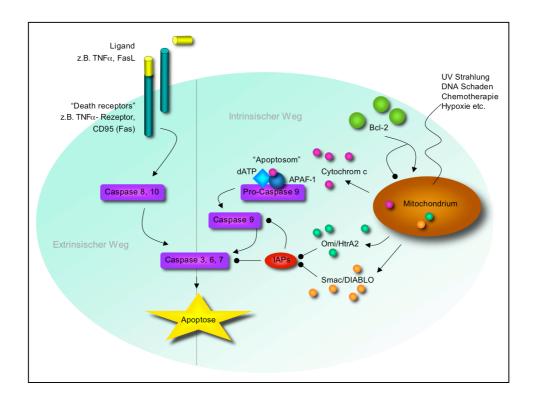


Abb.1: Schematische Darstellung der Apoptose (modifiziert nach Plati et al. 2008) Durch Bindung entsprechender Liganden an TNF- bzw. Fas-Rezeptoren kommt es beim extrinsischen Weg über die Caspasen 8 und 10 zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. Ausgelöst u.a. durch DNA-Schäden oder UV-Strahlung wird beim intrinsischen Weg durch eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran Cytochrom c in das Zytoplasma entlassen. Dieses bildet zusammen mit dATP, APAF-1 und Procaspase 9 ein so genanntes Apoptosom für die Aktivierung der Caspase 9. Über die Caspase 3 treffen intrinsischer und extrinsischer Weg aufeinander und führen zum Abbau der apoptotischen Zelle. Bcl-2 kann die Cytochrom c Freisetzung sowohl hemmen als auch fördern, die IAPs wirken durch Inhibition der Caspasen 3, 7 und 9 antiapoptotisch. Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 haben durch Hemmung der IAP Funktion eine proapoptotische Wirkung.

Morphologische Kennzeichen der apoptotischen Zelle sind Schrumpfung, Kondensation des Chromatins und Ausbildung einer blasenähnlichen Oberfläche [Wang *et al.* 2005]. Abschnürungsprozesse führen zur Fragmentation der Zelle in so genannte "apoptotic bodies" [Twomey und McCarthy 2005, Wang *et al.* 2005, Sun und Peng 2009], die durch benachbarte Zellen phagozytiert werden, wodurch eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes ausbleibt [Sun und Peng 2009].

Eine Fehlregulation der Apoptose wird als pathogener Mechanismus bei der Entstehung neurodegenerativer Veränderungen und Autoimmunerkrankungen diskutiert [Züllig und Hengartner 2004, Ho und Hawkins 2005, Yan und Shi 2005]. Des Weiteren spielt eine gesteigerte Resistenz von Zellen gegenüber pro-apoptotischen Stimuli, durch das entstehende Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod, eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Progression maligner Tumoren [Igney und Krammer 2002]. gesteigerten Apoptoseresistenz Grundlage einer kann dabei sowohl Überexpression anti-apoptotischer-, als auch eine verminderte Expression proapoptotischer Apoptoseregulatoren sein [Igney und Krammer 2002]. In diesem Zusammenhang wurden beim Menschen bisher vor allem zwei große Gruppen von Apoptoseregulatoren untersucht: die Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-Proteinfamilie und die IAP (inhibitor of apoptosis)-Proteinfamilie [Nachmias et al. 2004, Wong und Puthalakath 2008].

1.7 Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs)

IAPs sind eine in der Evolution hoch konservierte Gruppe von Proteinen, deren gemeinsames Strukturmerkmal das Vorhandensein mindestens einer BIR (*Baculovirus IAP Repeat*)-Domäne darstellt [Salvesen und Duckett 2002].

Bislang konnten die folgenden acht humanen IAPs identifiziert werden: cIAP1, cIAP2, XIAP, Survivin, Livin, Bruce, ILP-2 und NAIP [Nachmias et al. 2004]. IAPs, allen voran XIAP, können über die Inhibierung von Initiator- und Effektor-Caspasen sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Apoptosekaskade hemmen. Dieser Mechanismus galt lange Zeit als Schlüsselfunktion der IAPs [Deveraux und Reed 1999, Nachmias et al. 2004]. 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 [Dubrez-Daloz et al. 2008, Srinivasula und Ashwell 2008]. Einigkeit besteht aber dahingehend, dass die in zahlreichen Tumorzelllinien und Tumorentitäten beobachtete Überexpression von **IAPs** einen effektiven Apoptoseinduktion vermittelt [Nachmias et al. 2004].

Entsprechend konnte nicht nur in Nierenzellkarzinomen [Ramp et al. 2004, Yan et al. 2004, Parker et al. 2006, Krambeck et al. 2007], sondern auch in zahlreichen anderen Tumorentitäten wie z.B. Ösophaguskarzinomen [Grabowski Kolonkarzinomen [Krajewska et al. 2005], Blasenkarzinomen [Ku et al. 2004, Wang H et 2005], Cervixkarzinomen [Imoto et 2004. Weikert et al. Bronchialkarzinomen [Hofmann et al. 2002], Neuroblastomen [Kim et al. 2005], Magenkarzinomen [Shibata et al. 2008], Mammakarzinomen [Sohn et al. 2006] und Lymphomen [Tröger et al. 2007] eine vermehrte Expression verschiedener IAPs nachgewiesen werden, was zum Teil mit Progression, gesteigerter Therapieresistenz und schlechterer Prognose assoziiert war.

1.8 IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2

Die IAP-vermittelte Inhibition der Apoptose kann durch die IAP-Gegenspieler Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP binding protein with low pl), Omi/HtrA2 (Omi/High temperature requirement protein A2) und durch XAF1 (XIAP-associated factor 1) antagonisiert werden [Shibata et al. 2008].

Smac/DIABLO wird durch nukleäre Gene kodiert und nach Proteintranslation im Mitochondrium gelagert [Xie et al. 2006, Martinez-Ruiz et al. 2008]. Durch Bindung entsprechender Liganden an TNFα- bzw. Fas-Rezeptoren, wird das pro-apoptotische BID (*BH3 interacting domain death agonist*) mit Hilfe von Caspase 8 zu tBID (*truncated BH3 interacting domain death agonist*) umgewandelt. tBID erhöht die Permeabilität der mitochondrialen Außenmembran, wodurch Smac/DIABLO in das Zytoplasma entlassen wird und dort die anti-apoptotische Wirkung diverser IAPs (XIAP, cIAP-1, cIAP-2, Survivin) antagonisiert [Wei et al. 2000, Grinberg et al. 2002, Hegde et al. 2002, Martinez-Ruiz et al. 2008]. Die Interaktion mit den IAPs wird über ein spezifisches Tetraprotein am N-Terminus von Smac/DIABLO, bestehend aus 4 hydrophoben Aminosäuren (Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin), vermittelt [Shiozaki und Shi 2004, Martinez-Ruiz et al. 2008].

Auf diese Weise konkurriert Smac/DIABLO mit Caspase 9, die eine ähnliche endständige Gruppe (Alanin-Threonin-Prolin-Phenylalanin) besitzt, um die Bindungsstelle an der BIR3 Domäne von XIAP, während die Caspasen 3 und 7 mit Smac/DIABLO um die BIR2 Domäne von XIAP konkurrieren [Verhagen und Vaux 2002, van Gurp et al. 2003, Martinez-Ruiz et al. 2008]. Zusätzlich vermag Smac/DIABLO cIAP-1 und -2 selektiv zu degradieren und die Selbstdegradierung von XIAP zu induzieren [Yang und Du 2004, Martinez-Ruiz et al. 2008].

Umgekehrt vermögen die IAPs Livin, XIAP, cIAP-1, cIAP-2 und Bruce jedoch auch ihren Antagonisten Smac/DIABLO zu degradieren [Abbildung 2] [Hu und Yang 2003, Hao *et al.* 2004, Wilkinson *et al.* 2004, Morizane *et al.* 2005, Ma *et al.* 2006]. Neben dieser posttranslationalen Regulation konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Transkription von Smac/DIABLO-Expression durch den E2F1 Transkriptionsfaktor vermittelt wird [Xie *et al.* 2006].

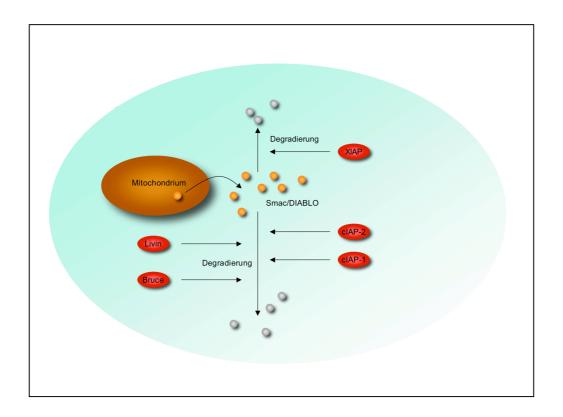


Abb.2: **Vereinfachte Darstellung der Regulation von Smac/DIABLO durch IAPs** (modifiziert nach Martinez-Ruiz *et al.* 2008) Das aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma entlassene Smac/DIABLO wird durch die IAPs XIAP, cIAP-1 und -2, sowie Livin und Bruce abgebaut.

Die Serinprotease Omi/HtrA2 ist ebenfalls ein pro-apoptotisches mitochondriales Protein, das während der Apoptose gemeinsam mit Smac/DIABLO und Cytochrom c in das Zellplasma entlassen wird [van Gurp et al. 2003, Suzuki et al. 2004]. Dabei interagiert es mit den IAPs auf ähnliche Weise wie Smac/DIABLO [van Gurp et al. 2003].

Trotz vieler Gemeinsamkeiten weisen beide Proteine charakteristische Unterschiede auf. Wie in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt, degradiert Omi/HtrA2 nicht nur cIAP-1 und -2, sondern auch XIAP und ist sowohl am Caspase-abhängigen als auch am Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod beteiligt [Hegde et al. 2002, van Loo et al. 2002, van Gurp et al. 2003, Suzuki et al. 2004, Martinez-Ruiz et al. 2008]. Darüber hinaus weisen Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 unterschiedliche Verteilungsmuster auf: Während Smac/DIABLO in Herz, Leber, Nieren und Hoden vorkommt, kann es in Skelettmuskel, Lunge, Thymus und Gehirn kaum oder überhaupt nicht detektiert werden [van Gurp et al. 2003]. Omi/HtrA2 ist dagegen ubiquitär exprimiert [van Gurp et al. 2003].

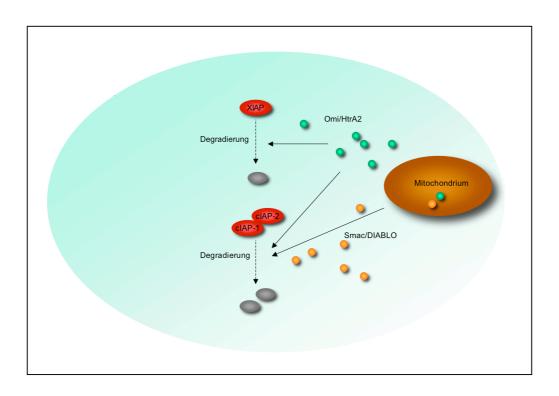


Abb.3: Vereinfachte Darstellung der Interaktion von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit den IAPs (modifiziert nach Martinez-Ruiz et al. 2008) Smac/DIABLO degradiert cIAP-1 und -2, nicht aber XIAP, während Omi/HtrA2 cIAP-1, -2 und XIAP abbaut.

Entsprechend ihrer funktionellen Eigenschaften kann neben einer vermehrten Expression der IAPs auch eine verminderte Expression ihrer Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 eine gesteigerte Apoptoseresistenz bedingen und somit ebenfalls zur Entstehung, zum Fortschreiten und zum schlechten Therapieansprechen maligner Tumoren beitragen [Fulda 2008, LaCasse *et al.* 2008]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Plasmakonzentration von Omi/HtrA2 in Ovarialkarzinomzellen zur Resistenz gegenüber Cisplatin und damit dem Therapieversagen beiträgt [Yang *et al.* 2005]. Anhand von Studien am hepatozellulären Karzinom [Bao *et al.* 2006] und am testikulären Keimzelltumor [Kempkensteffen *et al.* 2007] konnte ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Smac/DIABLO-Expression und Tumorprogression demonstriert werden und in Untersuchungen am Bronchialkarzinom korrelierte eine niedrige Smac/DIABLO-Expression mit einer ungünstigen Prognose der Patienten [Sekimura *et al.* 2004].

Die o.g. Erkenntnisse lassen die Untersuchung der Expression von IAPs und ihren Gegenspielern im Hinblick auf mögliche funktionelle, therapeutische und prognostische Aspekte, somit auch im Nierenzellkarzinom attraktiv erscheinen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des IAP Survivin im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinomen mit einem aggressiven Tumorverhalten und einer signifikant schlechteren Prognose korreliert ist [Parker et al. 2006, Byun et al. 2007, Parker et al. 2008, Zamparese et al. 2008]. Darüber hinaus konnten Ramp et al. in einer immunhistochemischen Untersuchung an 145 klarzelligen Nierenzellkarzinomproben nachweisen, dass eine ansteigende Expression des IAP XIAP signifikant mit einer Progression des T- und G-Stadiums korrelierte. XIAP konnte als unabhängiger prognostischer Parameter identifiziert werden [Ramp et al. 2004]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte wenig später parallel auch die mRNA-Proteinexpression von XIAP und Smac/DIABLO im Nierenzellkarzinom. In dieser Studie konnte nun auch eine direkte Korrelation der mRNA-Expression von XIAP mit der Tumorprogression nachgewiesen werden. wohingegen ein entsprechender Zusammenhang für Smac/DIABLO nicht bestand [Yan et al. 2004].

Hingegen konnten Mizutani et al. in einer Arbeit an 78 korrespondierenden Tumor- und Normalgewebeproben von Nierenzellkarzinompatienten zeigen, dass die Proteinexpression von Smac/DIABLO im Tumorgewebe, verglichen mit der in den entsprechenden Normalproben, signifikant vermindert war. Die Stärke Expressionsabnahme korrelierte dabei invers mit der Tumorprogression. Darüber hinaus zeigte eine univariate Überlebensanalyse, dass das Fehlen einer Expression von Smac/DIABLO im Tumorgewebe mit einer ungünstigen Prognose assoziiert war [Mizutani et al. 2005].

Entsprechende Untersuchungen lagen zum Zeitpunkt der Aufnahme meiner Promotionsstudien für Omi/HtrA2 im Nierenzellkarzinom nicht vor.

1.9 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das mRNA-Expressionsprofil der IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 im Tumorgewebe von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom unterschiedlicher Tumorstadien und Tumordifferenzierung zu untersuchen. Der Schwerpunkt der Studie lag dabei auf der Evaluation der mRNA-Expression dieser Apoptoseregulatoren im Hinblick auf ihre potentielle Eignung als Marker der Tumorprogression oder Prognose. Darüber hinaus war die Erforschung einer Korrelation der mRNA-Expression beider mitochondrialer IAP-Antagonisten Gegenstand der Untersuchung, da die Transkription beider Gene möglicherweise über den gemeinsamen Transkriptionsfaktor E2F1 reguliert wird [Xie et al. 2006].

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung und Aufarbeitung der Präparate

2.1.1 Asservierung der Proben

Das in dieser Arbeit untersuchte Tumorgewebe stammte von insgesamt 85 Patienten, die aufgrund eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms im Zeitraum zwischen November 1995 und November 2005 in der Urologischen Klinik und Hochschulambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, nephrektomiert wurden. Das Probenmaterial wurde jeweils im Rahmen einer radikalen Tumornephrektomie entnommen und zeitnah im Institut für Pathologie asserviert. Ein Teil des Gewebes wurde für molekularbiologische Untersuchungen unmittelbar nach Erhalt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Für die Probenasservierung und deren Verwendung für molekularbiologische Untersuchungen lag ein positives Votum der Ethikkommission der Freien Universität Berlin vor. Es wurden nur Patienten einbezogen, die dem Einschluss ihrer persönlichen Daten und Gewebeproben in die Tumordatenbank des urologischen Forschungslabors zur molekularen Tumoranalytik zugestimmt und eine entsprechende Einverständniserklärung unterzeichnet hatten. Sämtliche Daten wurden gemäß den gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzes vertraulich behandelt.

Es wurden ausschließlich Patienten mit einem histologisch gesicherten klarzelligen Nierenzellkarzinom in die Arbeit eingeschlossen. Die histopathologische Beurteilung der Tumoren wurde gemäß der TNM Klassifikation der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) von 1997 durch die Abteilung für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt:

	Stadien	Anzahl Patienten
T-Stadium	pT1	42
	pT2	20
	рТ3	23
G-Stadium	G1	1
	G2	52
	G3	32
M-Stadium	MO	78
	M1	7

Tab.1: Klassifikation der Patienten nach histopathologischen Gesichtspunkten

Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Nephrektomie bereits Metastasen bestanden (n=7), erhielten zusätzlich zur Tumornephrektomie eine adjuvante Immunchemotherapie entsprechend dem 1993 von Atzpodien *et al.* publizierten Protokoll [Atzpodien *et al.* 1993]. Dabei handelte es sich um eine Kombinationstherapie aus Interleukin-2, Interferon- α und 5-Fluorouracil. Das gleiche Therapieschema wurde angewendet, wenn Patienten im weiteren postoperativen Verlauf Metastasen entwickelten.

2.1.2 Aufbereitung der Proben

Mit einem Gefriermikrotom wurden zunächst 5µm dünne Kryoschnitte der Tumorproben angefertigt, jeweils auf einen Objektträger aufgebracht und für wenige Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Ethanol (96%) fixiert und schließlich mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. So wurden innerhalb der Tumorbiopsien Bereiche identifiziert, die vorwiegend (>80%) malignes Gewebe enthielten und damit für die RNA-Extraktion geeignet waren.

Die Gewebeblöcke wurden im Anschluss unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Rasierklinge auf die entsprechenden Bereiche getrimmt und danach weitere 25µm dünne Schnitte für die spätere RNA-Extraktion angefertigt.

Um zu gewährleisten, dass die Schnitte mindestens 80% Tumorzellen enthielten, wurde wiederum jeder zehnte Schnitt einer Probe HE-gefärbt und der Block ggf. nochmals neu getrimmt.

2.1.3 RNA-Extraktion

Mit dem RNeasy® Mini Kit wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurden 20mg Tumorgewebe zunächst mit RLT-Puffer lysiert und homogenisiert, dann 3min bei 20000G zentrifugiert und der Überstand mit 70%igem Ethanol versetzt. Die durch erneutes Zentrifugieren herausgefilterte RNA wurde dann dreimal mit RW1-Puffer gewaschen und schließlich in 50µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentrationen sowie der A₂₆₀/A₂₈₀-Quotient wurden mit dem NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Um eine einheitliche Endkonzentration von 250ng/4µl für alle Proben zu erreichen, wurde mit Hilfe der jeweils gemessenen Ausgangskonzentration der entsprechende Verdünnungsfaktor berechnet und die daraus resultierende Menge an RNase-freiem Wasser zugegeben. Zur Qualitätsprüfung der RNA-Isolierungen wurde eine Analyse auf dem Agilent-Bioanalyzer 2100 durchgeführt. Die dabei ermittelten RIN-Werte (RNA integrity number) erlaubten die Beurteilung der Integrität der Proben, basierend auf einer Skala von 1 (weitgehend zerstörte RNA) bis 10 (vollständig intakte RNA). Für die Studie wurden nur RNA-Präparationen mit RIN-Werten ≥ 7 verwendet.

2.1.4 Real-time RT-PCR

Die quantitative Expressionsanalyse der Zielgene Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 sowie des Referenzgens h-PBGD (humane Porphobilinogen-Desaminase) erfolgte mittels real-time RT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction) auf dem LightCycler® unter Verwendung der LightCycler® Software-Version 3.5.3. Bei dieser Methode werden neben den Amplifikationsprimern zwei fluoreszenz-markierte Oligonukleotide als Hybridisierungssonden verwendet.

Befinden sich diese beiden Sonden während der Hybridisierung in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander, entsteht ein messbares Fluoreszenzsignal (Fluorescence resonance energy transfer = FRET). Mit steigender Menge der PCR-Produkte nimmt das FRET Signal zu und kann zur Quantifizierung der Nukleinsäuren eingesetzt werden.

Die durchgeführten Fluoreszenz-Messungen werden während der PCR-Zyklen erfasst und können in Echtzeit ("real-time") an einem Computer verfolgt werden. Für die grafische Darstellung wird anschließend die gemessene Fluoreszenzaktivität gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen.

Es wurde das Verfahren zur Bestimmung der relativen Genexpression unter Verwendung von externen Standards angewendet. Hierbei wurde mit Hilfe von Standardkurven jeweils ein dimensionsloser Quotient aus der Kopienzahl der entsprechenden Zielgene (Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2) und dem Referenzgen (h-PBGD) gebildet.

2.1.4.1 Erstellung der Standardkurven

Mit Hilfe von separat erstellten Verdünnungsreihen wurden zunächst Standardkurven für die relative Quantifizierung der Expression der Zielgene generiert (Abb. 4 und 5). Im Falle des Referenzgens h-PBGD war die Verdünnungsreihe bereits im Lieferumfang des LightCycler® h-PBGD Housekeeping Gene Set enthalten.

Statt in vitro-generierte RNA-Standards zu verwenden, wurden die Standardkurven für Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2 aufgrund der größeren Stabilität aus amplifizierter cDNA der jeweiligen Gene generiert. Hierfür wurde die Zellinie HeLa in Kultur genommen, RNA extrahiert und mit Hilfe des *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation wurde jeweils mit den flankierenden Primern der Zielgene, die auch bei der real-time RT-PCR verwendet wurden, durchgeführt.

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in MEM (Minimum Essential Medium) unter Zusatz von 2mM L-Glutamin, 1,5g/l Natriumbicarbonat, 10mM Natriumpyruvat sowie 10% fötalem bovinen Serum und 0,1mM nicht essenziellen Aminosäuren. Bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Das Ernten bzw. Ablösen der Zellen von der Kulturflasche erfolgte mit Trypsin (0,25%), gefolgt von zehnminütigem Zentrifugieren bei 14000rpm. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Die Pellets wurden in 1ml PBS resuspendiert, für 25s bei 20000G zentrifugiert und konnten bei -80°C aufbewahrt bzw. der RNA-Aufarbeitung zugeführt werden. Die Extraktion der Gesamt-RNA aus den HeLa-Zellen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy*[®] *Mini Kit* nach oben beschriebenem Protokoll.

Das Umschreiben der auf diese Weise isolierten Gesamt-RNA in cDNA im *LightCycler*® wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	Schritt	Komponenten	PCR- Bedingungen/Prozedere	
1	Denaturierung	2,5µg RNA	5min, 65°C	
		+ 1,0µl Oligo(dT) Primer		
		+ 1,0µl 10mM dNTP mix		
		+ 5,5µl DEPC Wasser		
2			1min auf Eis lagern	
3	Annealing	2,0µl 10x PCR-Puffer	2min, 42°C	
		+ 4,0µl 25mM MgCl ₂		
		+ 2,0µl 0,1M DTT		
		+ 1,0µl RNaseOUT™		
		+ RNA/Primer Mix		
4		+ 1,0µl SuperScript™ II RT		
5	cDNA Synthese		50min, 42°C	
			15min, 70°C	
6	Entfernung RNA	20,0µl cDNA	20min, 37°C	
		+ 1,0µl RNase H		
7			Lagerung bei -20°C oder PCR	

Tab.2: Protokoll cDNA-Synthese aus der isolierten Gesamt-RNA der HeLa Zelllinie

Die, wie aufgezeigt, generierte cDNA wurde anschließend mit dem *QIAQuick Purification Kit* gereinigt und ihre Konzentration mittels *NanoDrop® ND-1000* bestimmt. Bei Kenntnis der Produktlänge/Sequenz (Smac/DIABLO = 205 Basenpaare, Omi/HtrA2 = 137 Basenpaare) wurde nun das Molekulargewicht bestimmt (Länge in Basenpaare x 660) und mittels der Loschmidt´schen Konstante die Kopiezahl/µl für den betreffenden Standard nach folgender Formel berechnet:

$$Kopiezahl/\mu l = \frac{Konzentration \left[g/\mu l\right]x\ 6,0234x 10^{23} \left[Kopien/mol\right]}{Molekul\arg ewicht \left[g/mol\right]}$$

Die seriellen Verdünnungen der cDNA-Standards wurden mit RNase-freiem Wasser in 1:10 Schritten hergestellt.

Die jeweiligen Kopiezahlen wurden anschließend mit dem *LightCycler*® gemäß des Protokolls in Tabelle 3 gemessen und auf diese Weise für die einzelnen PCR-Läufe der Tumorproben eine geeignete Konzentration als Standard definiert [siehe Abb. 4 und 5].

Schritt		Dauer	Temperatur	Kommentar	Zyklen
Reverse Transkription		600s	55°C		1
Denaturierung		30s	95°C		1
	Denaturierung	0,5s	95°C		
PCR	Annealing	15s	52°C (Smac/DIABLO) 55°C (Omi/HtrA2)	Fluoreszenz- Ablesung durch das Gerät	45
	Elongation	20s	72°C		

Tab.3: PCR-Protokoll für die Erstellung der Standardkurven

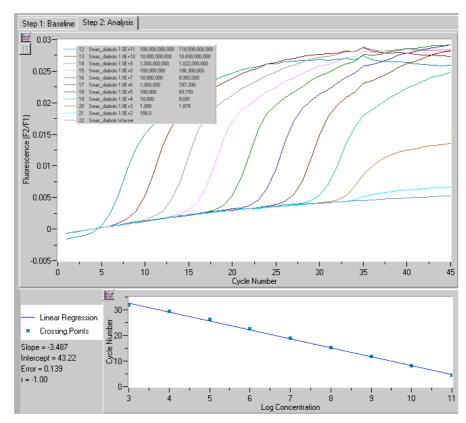


Abb.4: Standardkurve für Smac/DIABLO

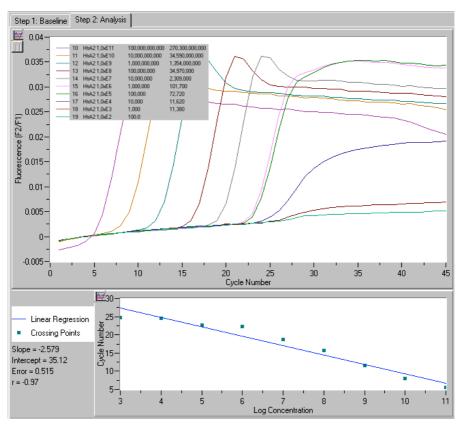


Abb.5: Standardkurve für Omi/HtrA2

2.1.4.2 Bestimmung der relativen Genexpression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in den Tumorproben

Unter Verwendung des *LightCycler*[®] *RNA Amplification Kit Hybridization Probes* erfolgte die quantitative Bestimmung der Expression der Zielgene auf dem *LightCycler*[®].

Das in Tabelle 4 abgebildete Protokoll/Pipettierschema diente als Grundlage für die Bestimmung der relativen Genexpression. Die jeweiligen Annealing-Temperaturen für Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Hybridisierungsproben sind den Tabellen 8 und 9 zu entnehmen.

Die Expression des Referenzgens h-PBGD wurde mit dem *LightCycler*[®] *h-PBGD Housekeeping Gene Set* bestimmt.

Komponente	Zielgen	h-PBGD
RNAse freies Wasser	6,4µl	7,2µl
MgCl ₂ (6mM)	2,4µl	2,4µl
LightCycler RT-PCR Reaction Mix	4,0µl	4,0µl
Primer Mix (Amplifikationsprimer) bzw. h-PBGD Detection Mix	2,0μΙ	2,0μΙ
Hybridization Probes (je 0,4µl)	0,8µl	n.a.
RT-Mix (Enzym)	0,4μΙ	0,4μΙ
Tumorproben RNA [250ng/4µl]	4,0µl	4,0µl
Gesamtvolumen	20μΙ	20μΙ

Tab.4: Pipettierschema für die Bestimmung der relativen Genexpression der Zielgene auf dem LightCycler®

Die Emission des Fluoreszenzsignals wurde während des Annealing gemessen, d.h. nach dem Binden beider Hybridisierungssonden an die Ziel-RNA. Nach insgesamt 45 Amplifikationszyklen wurde die relative Expression der Zielgene als dimensionsloser Quotient wie folgt bestimmt: Kopiezahl(Zielgen) / Kopiezahl Referenzgen(h-PBGD). Jedem PCR-Lauf wurde ein cDNA-Standard des entsprechenden Zielgens mit bekannter Kopiezahl als Standard und Positivkontrolle sowie eine Wasserprobe als Negativkontrolle beigefügt. Sämtliche Amplifikationen wurden einmalig wiederholt.

Schritt		Dauer	Temperatur	Kommentar	Zyklen
Reverse Transkription		10min	55°C		1
Inaktivierung der Reversen Transkriptase		30s	95°C		1
	Denaturierung	0,5s	95°C		
PCR	Annealing	15s	52°C (Smac/DIABLO)	Fluoreszenz- Ablesung durch das Gerät	45
			55°C (Omi/HtrA2)		
			59°C (h-PBGD)		
	Elongation	20s	72°C		

Tab.5: PCR-Protokoll für die Bestimmung der relativen Genexpression der Zielgene auf dem LightCycler®

2.2 Datenauswertung und Statistik

Die in die Studie eingeschlossenen Nierenzellkarzinom-Patienten wurden mit folgenden Angaben in einer Datenbank erfasst: Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Datum der Nephrektomie, T-Stadium, G-Stadium und M-Stadium. Die Nachsorge-Daten wurden telefonisch ermittelt. Dem Patienten, seinen Angehörigen oder den behandelnden Ärzten sind dabei die folgenden Fragen gestellt worden:

- 1. Wann war der Zeitpunkt der letzten Nachsorgeuntersuchung?
- 2. Wurde ein Tumorrezidiv festgestellt und wenn ja, wann und in welcher Lokalisation?

3. Ist der Patient inzwischen verstorben und wenn ja, wann und woran?

Für die Auswertung der Daten und zur Erstellung der Diagramme ist das Statistikprogramm *SPSS 13.0* der Firma SPSS Inc., Chicago, IL, USA verwendet worden.

Der Kruskal-Wallis-Test, ein parameterfreier statistischer Test, wurde zum Vergleich der Mittelwerte von mehr als zwei unabhängigen Stichproben eingesetzt. Dabei wurden den Original-Messwerten Rangplätze zugeordnet und diese dann gegenübergestellt. Um signifikante Unterschiede zwischen jeweils zwei dieser Stichproben festzustellen, ist der Mann-Whitney-U-Test angewendet worden. Auch dieser Test basiert auf Rangplätzen. Beide Tests prüften die Nullhypothese: "Zwischen den Gruppen besteht kein Unterschied".

Als Trendtest für unverbundene Stichproben ist der Jonckheere-Terpstra genutzt worden. Dieser wurde nach einem signifikanten Kruskal-Wallis-Test eingesetzt, wenn für die Mediane der Stichproben folgende Nullhypothese formuliert wurde: " $M_1 < M_2 < ...M_1$ ", wobei M für den Median der jeweiligen Stichprobe steht.

Mit Kaplan-Meier-Schätzungen wurde die Wahrscheinlichkeit geprüft, mit der ein bestimmtes Ereignis (Rezidiv oder tumorbedingter Tod) innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls (rezidivfreies bzw. tumorspezifisches Überleben) nicht eintrat.

Mit dem χ^2 -Test (Chi-Quadrat-Test) wurde der statistische Zusammenhang zwischen zwei Parametern auf ihre Signifikanz untersucht. Es wurde die Nullhypothese: "Beide Merkmale sind statistisch unabhängig voneinander" geprüft.

Als statistisch signifikant sind Unterschiede gewertet worden, wenn das Signifikanzniveau p unter 0,05 lag, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Die Nullhypothese wurde dann verworfen.

Mit Hilfe der Cox-Regression ist der Einfluss verschiedener Faktoren (T-, G- und M- Stadium, sowie Smac/DIABLO- und Omi/HtrA2-Genxpression) auf eine Zielvariable (Rezidiv oder tumorbedingter Tod) analysiert worden. Der daraus resultierende Hazardwert war ein Maß für die Stärke des Zusammenhangs bzw. diente der Beschreibung der Wahrscheinlichkeit, mit der die Zielvariable eintrat.

Während mit der univariaten Analyse jeweils eine Variable isoliert betrachtet wurde, konnte mit Hilfe der multivariaten Analyse das Zusammenwirken mehrerer Faktoren untersucht werden.

2.3 Materialien

2.3.1 Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Fötales Bovines Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hämatoxylin-Eosin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
LightCycler [®] h-PBGD Housekeeping Gene Set	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
LightCycler [®] RNA Amplification Kit Hybridization Probes	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
MEM (Minimum Essential Medium)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natriumbicarbonat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht Essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Oligo(dT) ₂₀ Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
QIAQuick Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-freies Wasser (DEPC)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zellinie HeLa	LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland

Tab.6: Reagenzien und Chemikalien

2.3.2 Geräte und Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland
Eppendorfröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5413	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefriermikrotom 2800 Frigocut-Evon	Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
Lichtmikroskop Axioplan	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen, Deutschland
LightCycler [®] Gerät	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
LightCycler [®] Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
LightCycler [®] Zentrifugen- Adapter im Kühlblock	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Gilson International B.V., Limburg-Offheim, Deutschland
	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortex (Vortex-Genie 2™)	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Tab.7: Geräte und Hilfsmittel

2.3.3 Primer und Hybridisierungsproben

2.3.3.1 Omi/HtrA2 (Genbank accession number: NM_013247, Produktlänge 137 Basenpaare)

Name	Sequenz	Hersteller
Omi/HtrA2 Amplifikationsprimer, vorwärts	5'-GAGATCCTGGACCGGCAC	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland
Omi/HtrA2 Amplifikationsprimer, rückwärts	5'-AGTCTCACACGGACTCTGCG	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland
Omi/HtrA2 Hybridisierungssonde FL	5'-GCAGCCACCACGAATCCTGAGCC- FL	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland
Omi/HtrA2 Hybridisierungssonde LC	5'- TTCGAGATAGGGACCTCGCGGCCC- PH	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland

Tab.8: Primer und Hybridisierungssonden Omi/HtrA2

2.3.3.2 Smac/DIABLO (Genbank accession number: NM_019887, Produktlänge 205 Basenpaare)

Name	Sequenz	Hersteller
Smac/DIABLO Amplifikationsprimer, vorwärts	5'-CCTTAACTTCTCTTTACCGAC	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland
Smac/DIABLO Amplifikationsprimer, rückwärts	5'-TCTGCGCCAGTTTGATA	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland
Smac/DIABLO Hybridisierungssonde FL	5'-AGCTGAGATGACTTCAAAACACCA- FL	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland
Smac/DIABLO Hybridisierungssonde LC	5'- GAGTACTTGAAGCTGGAAACCACTTG- PH	TIB MOLBIOL Berlin, Deutschland

Tab.9: Primer und Hybridisierungssonden Smac/DIABLO

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Studienpopulation

In die Studie ist das Tumorgewebe von 85 Patienten (34 Frauen und 51 Männer) mit einem medianen Alter von 62 Jahren (Streubreite: 36 - 87 Jahre) eingeschlossen worden, die aufgrund eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms zwischen 1995 und 2005 in der Urologischen Klinik und Hochschulambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, nephrektomiert wurden.

3.2 mRNA-Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Die mRNA von Smac/DIABLO konnte in allen 85 Proben nachgewiesen werden. Die mediane relative Genexpression betrug 15,3 (Streubreite: 2,2 - 534,4). Omi/HtrA2 wurde in 83 von 85 Tumorproben mit einer medianen relativen Genexpression von 23,4 (Streubreite: 0,0 - 815,8) detektiert. Die beiden Proben, in denen Omi/HtrA2 nicht nachgewiesen werden konnte, stammten von Patienten mit niedrig differenzierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Grad 3).

Zwischen den Expressionsniveaus beider Gene konnte eine enge Korrelation beobachtet werden (Pearson Korrelations-Koeffizient: 0,90; p<0,001).

3.2.1 Korrelation der Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit klinischen und pathologischen Parametern

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnte ein signifikanter Unterschied der Smac/DIABLO-Genexpression zwischen Patienten mit primärer Metastasierung, denen, die sekundär Metastasen entwickelten und Patienten, bei denen innerhalb der Nachsorgezeit keine Metastasen nachgewiesen werden konnten, gezeigt werden (p=0,016).

Dabei konnte ein signifikanter Trend in Richtung einer kontinuierlichen Zunahme der Smac/DIABLO-Genexpression in Tumoren von Patienten, die bereits bei Diagnosestellung Metastasen aufwiesen über die, deren Tumor sekundär metastasierte hin zu denen, die innerhalb der Nachsorgezeit keine Metastasen entwickelten, beobachtet werden (Jonckheere-Terpstra Test p<0,006) [Abb. 6].

Für Omi/HtrA2 konnte eine entsprechende Korrelation nicht nachgewiesen werden.

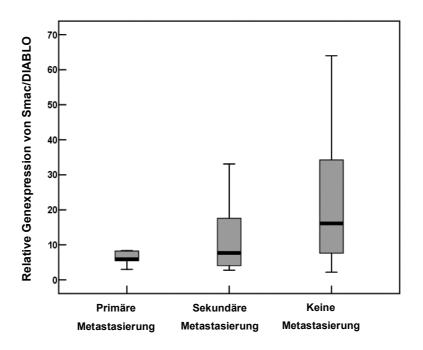


Abb.6: Deskriptive Statistik für die normalisierte Expression von Smac/DIABLO in klarzelligen Nierenzellkarzinomproben. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie die Streubreite exklusive der Extremwerte. Signifikanter Trend in Richtung einer graduellen Zunahme der Smac/DIABLO-Genexpression in folgender Reihenfolge: Patienten mit Primärmetastasen, Patienten mit nachgewiesener sekundärer Metastasierung, Patienten ohne Metastasierungsnachweis im Verlauf der Nachsorge.

Für weitere Analysen wurde die Studienpopulation in Untergruppen mit hoher und niedriger Smac/DIABLO-Genexpression dichotomisiert. Die mediane Smac/DIABLO-Genexpression wurde dabei willkürlich als Grenzwert zwischen beiden Gruppen definiert.

Entsprechend der inversen Korrelation der Expressionshöhe von Smac/DIABLO mit dem Auftreten von Metastasen war die Anzahl der Patienten, die primär Metastasen aufwiesen oder sekundär metastasierten in der Gruppe mit einer niedrigen Smac/DIABLO-Genexpression signifikant größer [15 von 43 (34,9%)], als in der Gruppe derer mit einer hohen Genexpression [5 von 42 (11,9%)] (p=0,013). Wie in Tabelle 10 dargestellt, fanden sich in zusätzlichen Analysen keine weiteren Assoziationen der Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit anderen relativen histopathologischen wie dem Tumorstadium oder Parametern dem Differenzierungsgrad. Auch konnten keine Korrelationen der Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit Patientencharakteristika wie Alter oder Geschlecht nachgewiesen werden [Tabelle 10].

In diesem Zusammenhang muss allerdings hervorgehoben werden, dass nur ein Patient mit einem gut differenzierten Nierenzellkarzinom (Grad 1) in die Studie eingeschlossen war. Für die Analyse wurde dieser daher mit den G2-differenzierten Nierenzellkarzinomen als eine Subgruppe zusammengefasst.

	n	Median (Streubreite)	Median (Streubreite)	
		Smac/DIABLO	Omi/HtrA2 Expression	
		Expression		
T-Stadium				
pT1	42	15,49 (2,19 - 257,77)	25,44 (0,00 - 236,08)	
pT2	20	9,08 (2,17 - 534,35)	21,81 (5,38 - 815,81)	
pT3	23	15,47 (2,85 - 58,91)	31,05 (0,00 - 252,70)	
p-Wert ^a		0,624	0,778	
G-Stadium				
G1/G2	53	12,66 (2,17 - 116,24)	27,86 (3,80 - 258,81)	
G3	32	15,56 (2,85 - 534,35)	22,24 (0,00 - 815,81)	
p-Wert ^b		0,452	0,779	
M-Stadium				
primäre Metastasierung	7	5,85 (3,04 - 16,84)	18,59 (9,30 - 29,85)	
sekundäre Metastasierung	13	7,65 (2,77 - 44,82)	20,21 (0,00 - 162,24)	
keine Metastasierung	65	16,17 (2,17 - 534,35)	35,16 (0,00 - 815,81)	
p-Wert ^a		0,016	0,235	
Geschlecht				
weiblich	34	10,63 (3,82 - 132,65)	21,92 (4,88 - 431,05)	
männlich	51	15,56 (2,17 - 534,35)	31,05 (0,00 - 815,81)	
p-Wert ^b		0,615	0,244	
Alter				
< 62 Jahre	42	15,56 (2,19 - 534,35)	31,35 (0,00 - 815,81)	
≥ 62 Jahre	43	12,30 (2,17 - 257,77)	22,00 (0,00 - 236,08)	
p-Wert ^b		0,660	0,437	

^a Kruskal-Wallis ANOVA; ^b Mann-Whitney U test

Tab.10: Korrelation der relativen Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit klinischen und pathologischen Parametern

3.2.2 Korrelation der Expression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit der Prognose

Nachsorgeinformationen konnten für alle 85 Patienten ermittelt werden. Das mediane Nachsorgeintervall betrug 47 Monate (Streubreite: 2 - 113 Monate).

Innerhalb der Nachsorgezeit verstarben 18 von 85 Patienten (21,2%) infolge ihres Nierenzellkarzinoms. Die mediane Überlebenszeit dieser Patienten betrug 18 Monate (Streubreite: 5 - 98 Monate) nach chirurgischer Intervention. Sieben Patienten (8,2%) hatten bereits zum Zeitpunkt der Nephrektomie Fernmetastasen. Bei 13 Patienten (16,7%) traten innerhalb eines medianen Zeitintervalls von 16 Monaten (Streubreite: 5 - 86 Monate) nach Tumornephrektomie sekundär Metastasen auf.

Um die Eignung der relativen Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 als prognostische Parameter zu evaluieren, wurden zunächst Kaplan-Meier-Überlebensanalysen durchgeführt. Hierzu wurde die Studienpopulation erneut in Untergruppen mit hoher und niedriger Smac/DIABLO- bzw. hoher und niedriger Omi/HtrA2-Genexpression dichotomisiert. Die jeweilige mediane relative Genexpression diente dabei wiederum als Grenzwert.

Patienten mit einer niedrigen Genexpression von Smac/DIABLO im Primärtumor hatten, im Vergleich zu Patienten mit einer hohen Expression, eine signifikant verkürzte rezidivfreie (76,7 Monate [95% CI: 57,8-95,7] vs. 87,5 Monate [95% CI: 80,4-94,5]; p=0,019) und tumorspezifische Überlebenszeit (66,5 Monate [95% CI: 48,9-84,1] vs. 86,8 Monate [95% CI: 79,1-94,4]; p=0,001).

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für Smac/DIABLO. Für die Patientengruppe mit einer hohen Smac/DIABLO-Genexpression betrug das geschätzte rezidivfreie 5-Jahresüberleben 90% und das geschätzte tumorspezifische 5-Jahresüberleben 92%. In der Gruppe mit einem niedrigen Smac/DIABLO-Expressionsniveau betrug das geschätzte rezidivfreie 5-Jahresüberleben hingegen nur 65% und das geschätzte tumorspezifische 5-Jahresüberleben lediglich 46%.

Das mediane tumorspezifische Überleben von Nierenzellkarzinompatienten mit Metastasen beträgt ca. 13 Monate [Cohen et al. 2005]. Um zu evaluieren, ob die Genexpression von Smac/DIABLO auch unabhängig vom Vorhandensein einer primären Metastasierung einen prognostischen Parameter für das tumorspezifische Überleben darstellt, wurden Patienten mit Primärmetastasen von einer weiteren Kaplan-Meier-Analyse ausgenommen. Auch nach Ausschluss dieser Patienten von der Analyse blieb eine niedrige Smac/DIABLO-Genexpression signifikant mit einem kürzeren tumorspezifischen Überleben assoziiert (p=0,015). Der prognostische Wert von Smac/DIABLO wurde darüber hinaus durch die Resultate der für das T-Stadium stratifizierten Kaplan-Meier-Analyse (pT1/pT2 und pT3) bestätigt. In beiden Strata war Smac/DIABLO-Expressionsniveau ein niedriges prädiktiv für ein verkürztes rezidivfreies- (p=0,006) und tumorspezifisches Überleben (p<0,001).

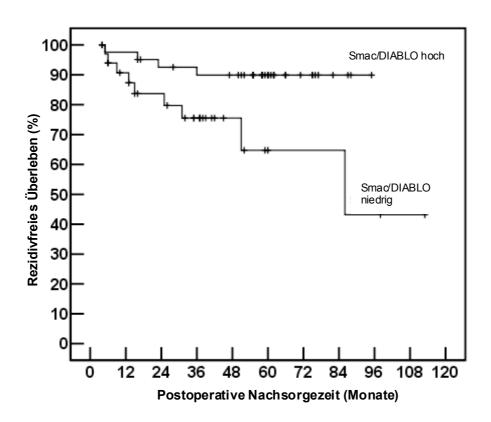


Abb.7: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie. Dies ist bei Patienten mit hoher Smac/DIABLO-Genexpression im Primärtumor im Vergleich zu denen mit niedriger Expression signifikant verlängert.

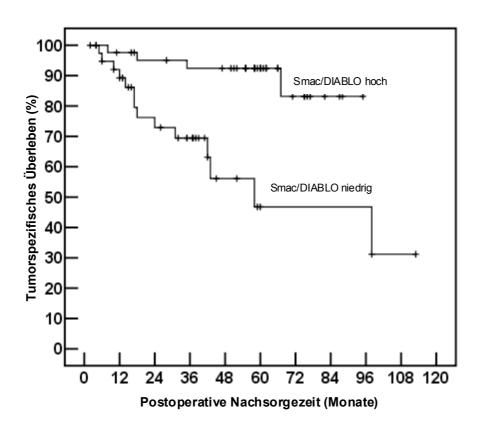


Abb.8: Kaplan-Meier-Kurve für das tumorspezifische Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie. Bei Patienten mit einer hohen Genexpression von Smac/DIABLO ist das tumorspezifische Überleben im Vergleich zu denen mit niedriger Genexpression signifikant verlängert.

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für Omi/HtrA2. Die Resultate ähneln denen der Smac/DIABLO Überlebensanalyse. Allerdings war die Assoziation einer niedrigen Genexpression von Omi/HtrA2 mit einem verkürzten rezidivfreien (81,6 Monate [95% CI: 64,7-98,5] vs. 81,3 Monate [95% CI: 74,7-87,7]; p=0,033) und tumorspezifischen Überleben (72,2 Monate [95% CI: 55,0-89,3] vs. 78,2 Monate [95% CI: 70,8-85,6]; p=0,032) weniger deutlich.

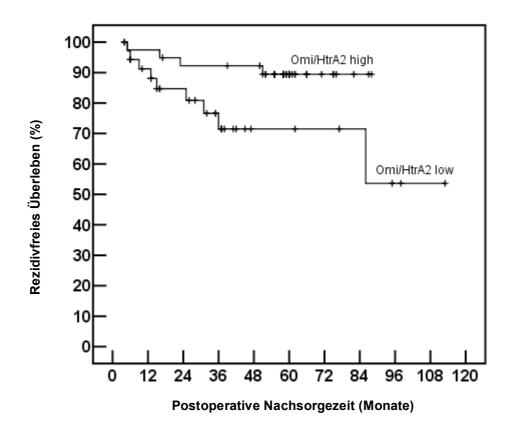


Abb.9: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie. Dies ist bei Patienten mit hoher Omi/HtrA2-Genexpression im Primärtumor im Vergleich zu denen mit niedriger Expression signifikant verlängert.

Bei Patienten mit hoher Omi/HtrA2-Genexpression betrug das geschätzte rezidivfreie 5-Jahresüberleben 89% und das geschätzte tumorspezifische 5-Jahresüberleben 84%. In der Gruppe mit einem niedrigen Omi/HtrA2-Expresssionniveau betrug das geschätzte rezidivfreie 5-Jahresüberleben lediglich 71% und das geschätzte tumorspezifische 5-Jahresüberleben 62%.

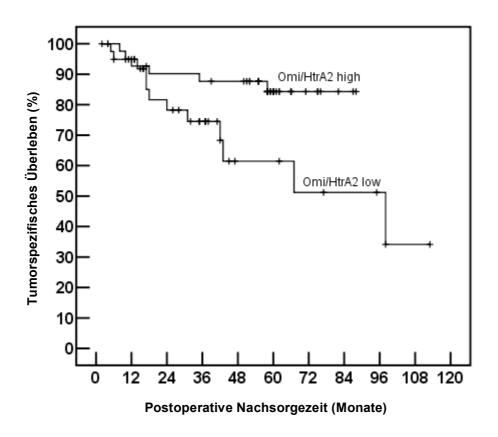


Abb.10: Kaplan-Meier-Kurve für das tumorspezifische Überleben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie. Bei Patienten mit einer hohen Genexpression von Omi/HtrA2 ist das tumorspezifische Überleben im Vergleich zu denen mit niedriger Genexpression signifikant verlängert

Um die prognostische Relevanz der relativen Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 weiter zu untersuchen, wurden nachfolgend uni- und mulitvariate Cox-Regressionanalysen durchgeführt.

In der univariaten Analyse waren sowohl niedrige Expressionsniveaus von Smac/DIABLO als auch von Omi/HtrA2 mit einem signifikant erhöhten Risiko für ein Rezidiv bzw. einen tumorbedingten Tod assoziiert [Tab. 11]. Des Weiteren wurden in der univariaten Analyse das T-Stadium als prognostisch relevant für das rezidivfreie und tumorspezifische Überleben und das M-Stadium als prognostisch relevant für das tumorspezifische Überleben identifiziert [Tab. 11].

	Rezidiv		Tumorbedingter Tod	
Univariate Analyse	Risiko (CI 95%)	p-Wert	Risiko (CI 95%)	p-Wert
Smac/DIABLO niedrig	3,81 (1,15 - 12,60)	0,029	6,03 (1,92 - 18,94)	0,002
Omi/HtrA2 niedrig	3,47 (1,03 - 11,65)	0,044	2,90 (1,05 - 7,98)	0,040
T-Stadium				
pT1	1		1	
pT2	12,61 (1,47 - 108,40)	0,021	7,73 (1,60 - 37,37)	0,011
рТ3	16,75 (2,05 - 137,12)	0,009	9,05 (1,92 - 42,69)	0,005
G-Stadium				
G1/G2	1		1	
G3	0,77 (0,24 - 2,52)	0,670	1,01 (0,39 - 2,62)	0,981
Primär- metastasen			18,68 (6,10 - 57,18)	< 0,001
	Rezidiv Tumorbedingter Tod			d
Multivariate Analyse	Risiko (CI 95%)	p-Wert	Risiko (CI 95%)	p-Wert
Smac/DIABLO niedrig	5,31 (1,16 - 24,21)	0,031	4,24 (1,22 - 14,77)	0,023
T-Stadium				
pT1	1		1	
pT2	15,10 (1,80 - 126,50)	0,012	6,28 (1,28 - 30,86)	0,024
рТ3	18,15 (1,87 - 176,25)	0,012	6,19 (1,11 - 34,60)	0,038
Primär- metastasen			5,92 (1,39 - 25,22)	0,016

Tab.11:Uni- und multivariate Cox-Regression (mit Vorwärtsselektion) für Rezidive und tumorbedingten Tod bei Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom im Anschluss an chirurgische Intervention.

Im Rahmen der Vorwärtsselektion fällt Omi/HtrA2 als Prognoseparameter heraus.

Um herauszufinden, ob die relative Genexpression von Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2 einen vom T- und M-Stadium unabhängigen prognostischen Wert für Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach Nephrektomie hat, wurde nachfolgend eine explorative multivariate Analyse durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden dabei nur Parameter eingeschlossen, die in der univariaten Analyse eine prognostische Relevanz aufwiesen. In dieser multivariaten Analyse behielten die Smac/DIABLO-Genexpression, das T-Stadium und das M-Stadium ihre prognostische Relevanz, die Genexpression von Omi/HtrA2 hingegen nicht [Tab. 11].

4 Diskussion

Widerstandsfähigkeit gegenüber Apoptose ist eine entscheidende Eigenschaft maligner Zellen [Igney und Krammer 2002]. Eine verminderte Expression proapoptotischer bzw. die Überexpression antiapoptotischer Gene werden u.a. als mögliche pathogene Mechanismen der Tumorgenese [Lee et al. 2003], sowie der Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie diskutiert [Igney und Krammer 2002, Reed 2006, Plati et al. 2008, Sun und Peng 2009]. Die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) zählen dabei zu den wichtigsten Apoptoseregulatoren, wobei ihrer Überexpression eine Schlüsselrolle bezüglich Tumorentstehung und -progression zugeschrieben wird [Nachmias et al. 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der proapoptotischen IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 beim klarzelligen Nierenzellkarzinom untersucht. Die Expressionsdaten wurden klinischen und histopathologischen Variablen der dazugehörigen Patienten gegenübergestellt und im Hinblick auf ihre Eignung als prognostische Parameter überprüft. Besonders für diese Tumorentität ist die Identifikation prognostischer Marker von hoher klinischer Relevanz, da die sehr heterogene Tumorbiologie und das hohe Metastasierungsrisiko durch bisher etablierte histopathologische Kriterien nur unzureichend dargestellt werden. Bislang gab es nur wenige Arbeiten mit entsprechenden Untersuchungen zu Smac/DIABLO [Yan et al. 2004, Mizutani et al. 2005] Für Omi/HtrA2 lagen bisher keine Daten zur Expression in Nierenzellkarzinomen vor.

Obwohl die Expressionshöhe beider Gene stark miteinander korrelierte, kann lediglich Smac/DIABLO als unabhängiger prognostischer Parameter für Nierenzellkarzinompatienten nach Nephrektomie in Betracht gezogen werden.

Die Evaluation der Smac/DIABLO und Omi/HtrA2-Expressionen erfolgte auf RNA-Ebene mittels real-time RT-PCR (LightCycler®, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland). Dabei handelt es sich um eine weit verbreitete Methode, die beinahe komplett automatisiert abläuft, was für ihre Anwendbarkeit im klinischen Alltag und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse spricht [Valasek und Repa 2005]. Mit Hilfe dieses hochsensitiven quantitativen Verfahrens sind potentielle Expressionsunterschiede zuverlässiger nachweisbar als durch den semiguantitativen Western Blot, der in anderen Studien zur Evaluation der prognostischen Relevanz von Smac/DIABLO eingesetzt wurde [Mizutani et al. 2005]. Es gilt jedoch zu beachten, dass aufgrund der hohen Sensitivität bereits geringste Veränderungen detektiert werden und mögliche Kontaminationen oder die Co-Amplifikation von Pseudogenen einen falsch-positiven Anstieg der PCR-Produkte verursachen können [Kubista et al. 2006]. Durch eine bei jedem Lauf mitgeführte Negativkontrolle zur Feststellung der Reinheit des Reaktionsgemisches konnten Kontaminationen in der vorliegenden Arbeit jedoch praktisch ausgeschlossen werden, während die Gefahr einer Amplifikation von Pseudogenen durch eine entsprechende Wahl der Primer minimiert wurde. Falschpositive Ergebnisse hätten darüber hinaus durch das Verschleppen von Kopien bei weiterführenden Analysen (wie z.B. der Gelelektrophorese) hervorgerufen werden können [Valasek und Repa 2005]. Da diese jedoch nicht zwingend notwendig waren und daher nicht durchgeführt wurden, senkte das "closed-tube-format" die Gefahr einer möglichen Verunreinigung.

Falsch negative Ergebnisse hätten durch Chelatbildung von Magnesiumionen, Inhibition der Polymerase oder DNase-Aktivität verursacht werden können [Hunecken 2007]. Durch die zusätzliche Amplifikation einer Positivkontrolle wurde jedoch auch diese Fehlerquelle nahezu ausgeschlossen.

Da in der quantitativen RT-PCR absolute Molekülzahlen gemessen werden, kann es, beispielsweise durch unterschiedliche Ausgangsmengen des Probenmaterials, zu methodisch bedingten Schwankungen der Messergebnisse kommen. Für eine akkurate Genexpressions-Analyse ist daher das Normalisieren gegen ein Referenzgen notwendig [Kubista *et al.* 2006].

Die Entität dieser so genannten Housekeeping-Gene kodiert für eine heterogene Gruppe von Proteinen, die für die Aufrechterhaltung verschiedener Zellfunktionen essentiell sind [Farthmann 2006]. Ihre Expression sollte idealerweise weder durch biologische Faktoren (Alter, Geschlecht, Metabolismus, Krankheitsstadium), noch durch experimentelle Faktoren (physikalisch, chemisch) beeinflussbar sein; somit wird sie als stabil angesehen [Jung et al. 2007]. Studien haben allerdings gezeigt, dass selbst diese Gene einer gewissen Regulation unterliegen [Kubista et al. 2006]. Weiterführende Analysen zur Wahl geeigneter Referenzgene für eine bessere Standardisierung von Untersuchungen zur mRNA-Expression waren deshalb notwendig. So verglichen Jung et al. die derzeit gängigsten Referenzgene, u.a. ACTB (ß-Actin) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), die bei Untersuchungen von Tumorproben klarzelliger Nierenzellkarzinome eingesetzt werden [Jung et al. 2007]. Lediglich PPIA (Peptidylprolylisomerase A) und TBP (TATA Box-bindendes Protein) sind gleich bleibend exprimiert und wurden für künftige Studien an klarzelligen Nierenzellkarzinomen als Referenzgene empfohlen [Jung et al. 2007]. Ein weiteres von untersuchtes Referenzgen. h-PBGD (humane Porphobilinogen-Desaminase), ist ein Enzym, das für die Porphyrinsynthese von Bedeutung ist und ubiquitär in Zellen vorkommt [Jung et al. 2007]. h-PBGD zeichnet sich durch eine stabile Expression aus. Pseudogene sind bisher nicht bekannt [Rettschlag 2003]. Wegen der hohen Standardisierung des entsprechenden kommerziell erhältlichen (LightCycler® h-PBGD Housekeeping Gene Set, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) wurde in der vorliegenden Arbeit h-PBGD als Referenzgen gewählt. Es bleibt fraglich, ob die Verwendung von PPIA oder TBP anstelle von h-PBGD im Hinblick auf die vorliegende Studie zu grundsätzlich anderen Ergebnissen geführt hätte.

Um potentielle, methodisch bedingte Variationen der Messergebnisse zu minimieren, wurden zusätzlich folgende Vorkehrungen getroffen: Jede RNA-Probe durchlief vor ihrer Weiterverarbeitung eine Qualitätskontrolle (Messung der RIN-Werte mit dem *Bioanalyzer 2100*, Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland) zur Beurteilung der Integrität der Nukleinsäuren und wurde ggf. von der Studie ausgeschlossen. Es wurden stets standardisierte Mengen der RNA verwendet. Sämtliche Untersuchungen wurden zur Bestätigung der Messergebnisse einmalig wiederholt.

Für statistische Analysen wurden vorzugsweise nicht-parametrische Tests eingesetzt, um die in der Regel bei Expressionsanalysen nicht normal-verteilten Messergebnisse zuverlässig analysieren zu können. Im Vergleich zu parametrischen Tests gelten diese als "robuster".

Entsprechend der hier vorliegenden quantitativen Analysen, konnte die mRNA von Smac/DIABLO in allen Tumorbiopsien nachgewiesen werden, während die Omi/HtrA2-mRNA bei 83 von 85 Patienten detektiert wurde. Auch in anderen Studien ließen sich Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in diversen Normalgeweben, unter anderem in der Niere [van Gurp et al. 2003], ebenso wie in verschiedenen Tumoren [Lee et al. 2003, Sekimura et al. 2004, Bao et al. 2006, Hu et al. 2006, Kempkensteffen et al. 2007] dokumentieren.

Die beiden Proben, in denen Omi/HtrA2 in der vorliegenden Studie nicht detektiert werden konnte, stammten von Patienten mit niedrig differenzierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Grad 3). Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer verminderten Genexpression von Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2 und zunehmender Entdifferenzierung erschien daher zunächst nahe liegend. In Übereinstimmung mit Yan et al. (2004) konnte in der vorliegenden Studie jedoch keine Korrelation der Smac/DIABLO-Genexpression mit histopathologischen Parametern Tumorstadium oder dem Differenzierungsgrad nachgewiesen werden [Yan et al. 2004]. Gleiches galt für Omi/HtrA2. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass nur ein Patient mit einem Grad 1 differenzierten Nierenzellkarzinom in die vorliegende Arbeit eingeschlossen war. Eine objektive Aussage zur Wechselbeziehung zwischen Genexpression und Differenzierungsgrad ist daher nur eingeschränkt möglich. Von Mizutani et al. wurden unterdessen gegensätzliche Befunde publiziert: Seiner Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer Wechselbeziehung zwischen verminderter Smac/DIABLO-Proteinexpression und fortgeschrittenem Tumorstadium sowie zunehmender Entdifferenzierung [Mizutani et al. 2005]. Da die, in seine Studie eingeschlossenen, Patienten mit niedriger Expression ohnehin lokal fortgeschrittene bzw. niedrig differenzierte Tumoren aufwiesen, kann von Mizutani et al. jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Smac/DIABLO-Proteinexpression auch unabhängig vom Tumorstadium als Prognosefaktor in Frage kommt [Mizutani et al. 2005].

Wie in der vorliegenden Studie, untersuchten sowohl Yan et al. als auch Mizutani et al. den Einfluss von Smac/DIABLO auf Tumorstadium und Differenzierungsgrad des Nierenzellkarzinoms, jedoch hat keine der beiden Arbeitsgruppen Untersuchungen hinsichtlich des Metastasierungsrisikos durchgeführt [Yan et al. 2004, Mizutani et al. 2005]. Da das Auftreten von Metastasen mit einer dramatischen Verschlechterung der Prognose einhergeht, besteht großes Interesse, Patienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko durch möglichst zuverlässig entsprechend akkurate prognostische Modelle zu erkennen [Gupta et al. 2008]. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche Zusammenhänge bzw. Assoziationen zwischen der Genexpression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 und dem Auftreten von Metastasen untersucht. Die Omi/HtrA2-Genexpression war nach den vorliegenden Ergebnissen nicht mit einer Metastasierung im Verlauf assoziiert. Demgegenüber konnten Unterschiede in der Smac/DIABLO-Genexpression im Tumorgewebe abhängig vom Auftreten von Metastasen aufgedeckt werden. Die Patientensubgruppen mit primärer Metastasierung, Metastasierung im Verlauf bzw. ohne Metastasen Nachbeobachtungsintervall unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit signifikant in Smac/DIABLO. Eine verminderte Smac/DIABLO-Expressionshöhe von Genexpression war signifikant mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko verbunden. Da dies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer niedrigen Expression der proapoptotischen IAP-Antagonisten und einer unvorteilhaften Prognose hindeutete, wurden in der vorliegenden Studie die Expressionen beider Gene und die Überlebensdaten der Patienten gegenübergestellt und analysiert. Mit den Ergebnissen konnte tatsächlich zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine verminderte mRNA-Expression von Smac/DIABLO im Nierenzellkarzinom signifikant mit einer verkürzten rezidivfreien und tumorspezifischen Überlebenszeit assoziiert ist und damit eine ungünstige Prognose anzeigt. Dies galt sowohl für Patienten mit auf die Niere beschränkten Tumoren, sowie für solche mit fortgeschrittenen Karzinomen. Ähnliche Resultate hatten Mizutani et al. publiziert: Patienten, in deren Nierenzellkarzinom Smac/DIABLO exprimiert war, hatten eine längere postoperative tumorspezifische Überlebenszeit als jene ohne eine solche Expression auf Protein-Ebene [Mizutani et al. 2005]. Die in der vorliegenden Studie untersuchte relative Genexpression von Omi/HtrA2 zeigte eine ähnliche Tendenz; im Vergleich zu Smac/DIABLO war diese jedoch weniger deutlich.

Obwohl die Expression von Smac/DIABLO in der vorliegenden Arbeit signifikant mit der von Omi/HtrA2 korreliert war, konnten explorative multivariate Tests prognostische Relevanz lediglich für Smac/DIABLO bestätigen. Die Smac/DIABLO-Genexpression kann demnach, anhand der hier vorliegenden Ergebnisse, als unabhängiger prognostischer Parameter für Nierenzellkarzinompatienten nach Nephrektomie in Betracht gezogen werden, Omi/HtrA2 erscheint demgegenüber als prognostischer Marker ungeeignet. Im Hinblick auf die identische Lokalisation von Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2 (mitochondrial) und deren übereinstimmender Funktion (IAP-Inhibition), ist diese Diskrepanz nur schwer zu deuten. In diesem Zusammenhang müssen zwei Studien, in denen die Omi/HtrA2-Expressionen in Magen- [Lee et al. 2003] und Prostatakarzinomen [Hu et al. 2006] untersucht wurden, berücksichtigt werden. Interessanterweise war Omi/HtrA2 in beiden Publikationen in den Tumorproben stärker exprimiert als im dazugehörigen Normalgewebe, wo es kaum bzw. überhaupt nicht detektiert werden konnte [Lee et al. 2003, Hu et al. 2006]. Aber auch im Fall von Smac/DIABLO deuteten immunhistochemische Untersuchungen an 100 Karzinomen und 50 Sarkomen unterschiedlicher Genese auf eine uneinheitliche Expression hin [Yoo et al. 2003]. Aus molekularbiologischer Sicht sind dermaßen divergente Ergebnisse schwer nachvollziehbar [Vande Walle et al. 2008]. Yoo et al. halten eine Überexpression des Apoptoseinhibitors Bcl-2, der die Freisetzung der IAP-Antagonisten aus dem Mitochondrium und damit die Apoptose blockiert, für eine mögliche Ursache [Yoo et al. 2003].

Für Malignome wie das hepatozelluläre Karzinom und Keimzelltumoren des Hodens, gibt es unterdessen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Smac/DIABLO-Expression und Tumorprogression [Bao et al. 2006, Kempkensteffen et al. 2007]. Untersuchungen am Lungenkarzinom deuteten sogar auf eine Eignung von Smac/DIABLO als prognostischer Marker hin [Sekimura et al. 2004]. Eine niedrige mRNA-Expression von Smac/DIABLO könnte demnach ein Hinweis auf besonders aggressive Tumoren sein. Dies wird durch weitere Ergebnisse von Mizutani et al. zusätzlich unterstrichen, nach denen eine deutlich verminderte Expression des Smac/DIABLO-Proteins im Metastasengewebe, verglichen mit der Expression in den jeweiligen Primärtumoren, demonstriert werden konnte [Mizutani et al. 2005].

Bezugnehmend auf die vorliegende Studie erscheint es daher nachvollziehbar, dass die Expressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in nicht-metastasierten Tumoren tendenziell höher sind und dass bei metastasierten Nierenzellkarzinomen eine niedrige Genexpression auf eine hohe Apoptoseresistenz, hervorgerufen durch ungehemmte IAP-Funktion, hinweisen könnte. Dies wird durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt, nach denen die Smac/DIABLO-Genexpression in Tumoren von Patienten, die bereits bei Diagnosestellung Metastasen aufwiesen, am niedrigsten ist, wohingegen bei Patienten mit sekundärer Metastasierung eine intermediäre Expressionshöhe festgestellt wurde, während bei Patienten ohne Metastasen die höchste Expression vorlag. Dies erklärt darüber hinaus die Minderexpression von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 bei Patienten mit einer unvorteilhaften Prognose in dieser Arbeit.

auf Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine funktionelle Wechselbeziehung zwischen verminderter Smac/DIABLO mRNA-Expression und der Entwicklung von Metastasen in Nierenzellkarzinompatienten hindeuten, können bezüglich der Relevanz für die Tumorbiologie von Nierenzellkarzinomen mit den vorliegenden Ergebnissen keine endgültigen Schlussfolgerungen gezogen werden. Aus molekularbiologischer Sicht müssen daher weitere Faktoren in Betracht gezogen werden, um den Einfluss der IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 auf das Malignitätspotenzial von Nierenzellkarzinomen vollständig zu erfassen.

Abgesehen von einer Regulation durch posttranskriptionale Prozesse, wie den Abbau von Smac/DIABLO durch IAPs wie XIAP [Silke et al. 2002, Wilkinson et al. 2004], konnten Xie et al. zeigen, dass die Smac/DIABLO-Expression zusätzlich einer transkriptionalen Kontrolle unterliegt [Xie et al. 2006]. Der Transkriptionsfaktor E2F1, ein Regulator der Zellproliferation, aktiviert Smac/DIABLO sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Dies resultiert in einer gesteigerten mitochondriumvermittelten Apoptose mit erhöhter Smac/DIABLO-Expression [Xie et al. 2006]. Da Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F1 nicht nur bei Smac/DIABLO, sondern auch bei Omi/HtrA2 gefunden wurden, ist es vorstellbar, dass beide mitochondrialen IAP-Antagonisten einer gemeinsamen Regulation durch E2F1 unterliegen [Xie et al. 2006]. Dies erscheint im Hinblick auf die starke Korrelation der Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in der vorliegenden Studie nachvollziehbar.

Zur abschließenden Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse, müssen gewisse Limitierungen der Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Zunächst schränken die begrenzten Fallzahlen die Anwendbarkeit multivariater statistischer Analysen ein. Nur ein Patient mit einem gut differenzierten Nierenzellkarzinom (G1) war in die Studie eingeschlossen, sodass, wie bereits erwähnt, eine objektive Beurteilung des Einflusses von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 auf den Differenzierungsgrad von Nierenzellkarzinomen nur ansatzweise möglich ist. In weiterführenden Untersuchungen ist daher eine ausreichend große und repräsentative Kohorte anzustreben.

Der Schwellenwert für eine hohe versus niedrige Genexpression von Smac/DIABLO bzw. Omi/HtrA2 war nur retrospektiv festzulegen. Die Eignung der Ergebnisse für die Vorhersage der Prognose von Nierenzellkarzinompatienten muss daher prospektiv mit Untersuchungen an einer Nachbeobachtungspopulation bestätigt werden. Für die Evaluation der Smac/DIABLObzw. Omi/HtrA2-Genexpression die Notwendigkeit einer Biopsie bzw. einer histologischen Beurteilung der Gewebeproben. Dies schließt die Anwendung als Verlaufsparameter im Rahmen von Nachsorgeuntersuchungen aus. Für diesen Zweck wären serum- oder urinbasierte Biomarker geeigneter. Da die Komplexität der intrazellulären Signaltransduktion mit der isolierten Betrachtung der mRNA-Expressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 nicht vollständig erfasst werden kann und da jede Methode nur einen begrenzten Informationswert für den Gesamtzusammenhang besitzt, bedarf es der Untersuchung weiterer Expressions- und Regulationsebenen, um die Relevanz der beobachteten Ergebnisse richtig einschätzen zu können. So steht die Bestätigung der vorliegenden Resultate auf Proteinebene aus. Diese Studie konzentrierte sich auf die häufigste Entität, das klarzellige Nierenzellkarzinom. Ein Vergleich mit anderen histologischen Subtypen wäre in weiterführenden Untersuchungen interessant.

Generell sollten Biomarker prognostische Informationen liefern, die aus bisher etablierten Modellen nicht gewonnen werden können, sie müssen standardisiert, reproduzierbar und kostengünstig sein [Crispen *et al.* 2008].

Ihre Anwendung ist jedoch nicht nur auf die Diagnostik, beispielsweise von Nierenzellkarzinomen, beschränkt, sie haben darüber hinaus Potenzial als mögliche therapeutische "*Targets*" [Crispen *et al.* 2008].

Erste Experimente erfolgten bereits unter der Annahme, dass das proapoptotische Smac/DIABLO ein Zielgen für neuartige Formen der Krebstherapie darstellen könnte. So gibt es viel versprechende Studien mit synthetischen Proteinen, die die Funktion von Smac/DIABLO nachahmen sollen, um die proapoptotische Wirkung von Chemotherapeutika zu verstärken [Martinez-Ruiz et al. 2008]. Dies gelang bereits in Mammakarzinom- [Arnt et al. 2002, Bockbrader et al. 2005] und Glioblastomzelllinien [Mizukawa et al. 2006], ebenso wie in Zelllinien des Osteosarkoms und des hepatozellulären Karzinoms [Zhao et al. 2006].

Ein weiterer Therapieansatz ist die Resveratrol (RES)-vermittelte Freisetzung von Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium und Aktivierung der Caspasen-3 und -9 [Sareen et al. 2007, van Ginkel et al. 2008].

Aufgrund des, selbst bei primär lokalisierter Erkrankung bestehenden, hohen Risikos Tumorprogression, sowie der ungünstigen Prognose bei metastasierten Nierenzellkarzinomen, wurden etliche prognostische Modelle zur Identifizierung diesbezüglich gefährdeter Patienten etabliert [Crispen et al. 2008]. Obwohl diese Modelle eine akzeptable diagnostische Genauigkeit bieten und durch deren Anwendung die Mehrzahl der Risikopatienten erkannt werden kann, wird die Prognose eines Großteils der Patienten nach wie vor fehlerhaft eingeschätzt. Um die Risikostratifikation zum Zeitpunkt der Nephrektomie zu optimieren, müssen weitere molekulare Parameter, wie beispielsweise Smac/DIABLO, erforscht werden. Patienten mit einem erhöhten Risiko für Rezidive oder Tumorprogression könnten von diesen Biomarkern und daraus resultierender Intervention früherer angemessener Nutzung adjuvanter bzw. Therapiestrategien profitieren [Crispen et al. 2008].

5 Zusammenfassung

Eine präzise Voraussage des Metastasierungsrisikos und der Tumorprogression klarzelliger Nierenzellkarzinome ist aufgrund der heterogenen Tumorbiologie nach wie vor schwierig. Um die Malignität individueller Tumoren einschätzen zu können, ist es daher notwendig, weitere prognostische Marker zu untersuchen und zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der mitochondrialen Apoptose-Inhibitor(IAP)-Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 im Tumorgewebe von 85 Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom untersucht sowie deren prognostische Relevanz evaluiert.

Das Probenmaterial wurde jeweils im Rahmen einer radikalen Tumornephrektomie entnommen und die relativen Genexpressionen von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 mit Hilfe von RT-PCR analysiert. Die gewonnenen Daten wurden den zugehörigen klinischen und histopathologischen Parametern, sowie der Überlebenszeit der Patienten gegenübergestellt (mediane Nachsorgezeit 47 Monate).

Dabei zeigte sich ein signifikanter Trend in Richtung einer kontinuierlichen Zunahme der die Smac/DIABLO-Genexpression in Tumoren von Patienten, bereits aufwiesen, über die. Diagnosestellung Metastasen deren Tumor metastasierte, bis hin zu denen, die innerhalb der Nachsorgezeit keine Metastasen entwickelten (p=0,006). Die Expressionsniveaus beider Gene korrelierten eng miteinander (Pearson Korrelations Koeffizient 0,90), standen jedoch in keiner Beziehung zum Tumorstadium oder dem Differenzierungsgrad klarzelliger Nierenzellkarzinome.

Patienten mit einer niedrigen Genexpression von Smac/DIABLO im Primärtumor hatten, im Vergleich zu Patienten mit einer hohen Expression, eine signifikant verkürzte rezidivfreie (76,7 Monate [95% CI: 57,8-95,7] vs. 87,5 Monate [95% CI: 80,4-94,5]; p=0,019) und tumorspezifische Überlebenszeit (66,5 Monate [95% CI: 48,9-84,1] vs. 86,8 Monate [95% CI: 79,1-94,4]; p=0,001).

Ähnliche Ergebnisse wurden für Omi/HtrA2 ermittelt, allerdings waren die expressionsabhängigen Unterschiede für das rezidivfreie (81,6 Monate [95% CI: 64,7-98,5] vs. 81,3 Monate [95% CI: 74,7-87,7]; p=0,033) und tumorspezifische Überleben (72,2 Monate [95% CI: 55,0-89,3] vs. 78,2 Monate [95% CI: 70,8-85,6]; p=0,032) weniger deutlich.

In der explorativen multivariaten Analyse behielt die Smac/DIABLO-Genexpression ihre prognostische Relevanz, die Expression von Omi/HtrA2 hingegen nicht.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die relative Genexpression von Smac/DIABLO, neben dem Tumorstadium und dem Vorhandensein von Primärmetastasen, als unabhängiger prognostischer Parameter für das klarzellige Nierenzellkarzinom in Betracht gezogen werden kann. Eine verminderte Expression des Gens war mit einer unvorteilhaften Prognose von Nierenzellkarzinompatienten assoziiert.

6 Literaturverzeichnis

Alexakis N, Connor S, Ghaneh P *et al.* **Hereditary pancreatic endocrine tumours**. Pancreatology. 2004; 4(5): 417-33

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*. The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(46): 44236-43

Atzpodien J, Kirchner H, Hänninen EL, Deckert M, Fenner M, Poliwoda H. Interleukin-2 in Combination with Interferon-α and 5-Fluorouracil for Metastatic Renal Cell Cancer. European Journal of Cancer. 1993; 29A Suppl 5: 6-8

Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International. 2006; 5(4): 580-3

Bellmunt J, Guix M. The medical management of metastatic renal cell carcinoma: integrating new guidelines and recommendations. BJU International. 2009; 103(5): 572-7

Bockbrader KM, Tan M, Sun Y. A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. Oncogene. 2005; 24(49): 7381-8

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(1): 34-7

Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R. **Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms.** Human Pathology. 2009; 40(1): 10-29

Cohen HT, McGovern FJ. **Renal-cell carcinoma**. The New England Journal of Medicine. 2005; 353(23): 2477-90

Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. **Immunotherapy for advanced renal cell cancer**. Cochrane Database Systematic Reviews. 2009; (1): CD001425

Crispen PL, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, Kwon ED. **Predicting disease** progression after nephrectomy for localized renal cell carcinoma: the utility of prognostic models and molecular biomarkers. Cancer. 2008; 113(3): 450-60

Dancey JE. **Therapeutic Targets, MTOR and Related Pathways.** Cancer Biology & Therapy. 2006; 5(9): 1065-73

Deveraux QL, Reed JC. **IAP family proteins-suppressors of apoptosis**. Genes and Development. 1999; 13(3): 239-52

Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. **IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins.** Cell Cycle. 2008; 7(8): 1036-46

Farthmann AJ. Quantifizierung und Charakterisierung der mRNA Expression des Urokinase Rezeptors uPAR (CD87) in Zelllinien und Tumorproben von Brustkrebs Patientinnen mittels quantitativer real-time RT-PCR. Medizinische Dissertation 2006. Technische Universität München

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. **Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006**. Annals of Oncology. 2007; 18(3): 581-92

Fulda S. Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for cancer therapy. Anticancer Agents in Medical Chemistry. 2008; 8(5): 533-9

Gill IS, Remer EM, Hasan WA *et al.* **Renal cryoablation: outcome at 3 years**. The Journal of Urology. 2005; 173(6): 1903-7

Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F *et al.* **Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma.** British Journal of Cancer. 2003; 88: 115-9

Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y *et al.* **tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis.** Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(14): 12237-45

Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C. **Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review**. Cancer Treatment Reviews. 2008; 34(3): 193-205

Hao Y, Sekine K, Kawabata A *et al.* **Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function**. Nature Cell Biology. 2004; 6(9): 849-60

Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z *et al.* **Identification of Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-Caspase Interaction.** The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(1): 432-8

Ho P, Hawkins CJ. **Mammalian initiator apoptotic caspases.** The FEBS Journal. 2005; 272: 5436-53

Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B. **Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer**. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2002; 128(10): 554-60

Hu S, Yang X. Cellular Inhibitor of Apoptosis 1 and 2 Are Ubiquitin Ligases for the Apoptosis Inducer Smac/DIABLO. The Journal of Biological Chemistry. 2003; 278(12): 10055-60

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(12): 893-8

Hunecken NM. Vergleich der **Light-cycler-PCR** mit anderen molekularbiologischen Nachweisverfahren zum Nachweis von Aspergillus- und Candida-DNA im Blut von Patienten nach allogener Knochenmarkstransplantation. Medizinische Dissertation 2007. Eberhard Karls Universität zu Tübingen.

Igney FH, Krammer PH. **Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis.**Nature Reviews Cancer. 2002; 2: 277-88

Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S, Inazawa J. Expression of cIAP1, a Target for 11q22 Amplification, Correlates with Resistance of Cervical Cancers to Radiotherapy. Cancer Research. 2002; 62: 4860-6

Janzen NK, Hyung LK, Figlin RA, Belldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. Urologic Clinics of North America. 2003; 30: 843-52

Jost L. Das Nierenzellkarzinom. Schweizerisches Medizin-Forum. 2003; 26: 614-19

Jung M, Ramankulov A, Roigas J *et al.* In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. BMC Molecular Biology. 2007; 8: 47

Kapitsinou PP, Haase VH. **The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice.** Cell Death and Differentiation. 2008; 15: 650-9

Kempkensteffen C, Jäger T, Bub J *et al.* **The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours**. International Journal of Andrology. 2007; 30(5): 476-83

Kim DK, Alvarado CS, Abramowsky CR *et al.* Expression of inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome. Pediatric and Developmental Pathology. 2005; 8(6): 621-9

Kosari F, Parker AS, Kube DM *et al.* Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. Clinical Cancer Research. 2005; 11(14): 5128-39

Krajewska M, Kim H, Kim C *et al.* Analysis of Apoptosis Protein Expression in Early-Stage Colorectal Cancer Suggests Opportunities for New Prognostic Biomarkers. Clinical Cancer Research. 2005; 11(15): 5451-61

Krambeck AE, Dong H, Thompson RH *et al.* Survivin and b7-h1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clinical Cancer Research. 2007; 13(6): 1749-56

Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee E, Lee SE. **Expression of Survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder.** The Journal of Urology. 2004; 171: 631-5

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M *et al.* **The real-time polymerase chain reaction.** Molecular Aspects of Medicine. 2006; 27(2-3): 95-125

LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. Oncogene. 2008; 27(48): 6252-75

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. **Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy**. The Journal of Urology. 2005; 173(6): 1853-62

Lee SE, Byun SS, Han JH, Han BK, Hong SK. **Prognostic significance of common preoperative laboratory variables in clear cell renal cell carcinoma**. BJU International. 2006; 98(6): 1228-32

Lee SH, Lee JW, Kim HS *et al.* Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer. APMIS. 2003; 111(5): 586-90

Levinson AW, Su LM, Agarwal D *et al.* Long-term oncological and overall outcomes of percutaneous radio frequency ablation in high risk surgical patients with a solitary small renal mass. The Journal of Urology. 2008; 180(2): 499-504

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. **The epidemiology of renal cell carcinoma**. The Journal of Urology. 2006; 176(6 Pt 1): 2353-8

Ljungberg B. **Prognostic markers in renal cell carcinoma**. Current Opinion in Urology. 2007; 17: 303-8

Ma L, Huang Y, Song Z et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. Cell Death and Differentiation. 2006; 13(12): 2079-88

Mancini V, Battaglia M, Ditonno P et al. Current insights in renal cell cancer pathology. Urologic Oncology. 2008; 26(3): 225-38

Margulis V, McDonald M, Tamboli P, Swanson DA, Wood CG. **Predictors of oncological outcome after resection of locally recurrent renal cell carcinoma**. The Journal of Urology. 2009; 181(5): 2044-51

Martel CL, Lara PN. **Renal cell carcinoma : current status and future directions.**Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2003; 45(2): 177-90

Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JPR, Melendez-Zajgla J. **Role of Smac/DIABLO in cancer progression**. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2008; 27: 48

Mizukawa K, Kawamura A, Sasayama T, Tanaka K, Kamei M, Sasaki M, Kohmura E. Synthetic Smac peptide enhances the effect of etoposide-induced apoptosis in human glioblastoma cell lines. Journal of Neuro-Oncology. 2006; 77(3): 247-55

Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K *et al.* **Downregulation of Smac/DIABLO Expression in Renal Cell Carcinoma and Its Prognostic Significance.** Journal of Clinical Oncology. 2005; 23(3): 448-54

Moore LE, Wilson RT, Campleman SL. Lifestyle Factors, Exposures, Genetic Susceptibility, and Renal Cell Cancer Risk: A Review. Cancer Investigation. 2005; 23: 240-55

Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. **X-linked inhibitor of apoptosis** functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic **Smac/DIABLO**. The Journal of Biochemistry. 2005; 137(2): 125-32

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. **Renal-cell carcinoma**. The New England Journal of Medicine. 1996; 335(12): 865-75

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P *et al.* **Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma.** The New England Journal of Medicine. 2007; 356(2): 115-24

Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. Seminars in Cancer Biology. 2004; 14: 231-43

Ng CS, Wood CG, Silverman PM, Tannir NM, Tamboli P, Sandler CM. **Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance.** American Journal of Roentgenology. 2008; 191(4): 1220-32

Parker AS, Kosari F, Lohse CM *et al.* 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(1): 37-45

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. Human Pathology. 2008; 39(8): 1176-84

Pascual D, Borque A. **Epidemiology of kidney cancer**. Advances in Urology. 2008: 782381

Patard JJ, Pouessel D, Bensalah K, Culine S. **Targeted therapy in renal cell carcinoma**. World Journal of Urology. 2008; 26(2): 135-40

Peycelon M, Hupertan V, Comperat E *et al.* Long-term outcomes after nephron sparing surgery for renal cell carcinoma larger than 4 cm. The Journal of Urology. 2009; 181(1): 35-41

Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. **Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities**. Journal of Cellular Biochemistry. 2008; 104(4): 1124-49

Ramp U, Krieg T, Caliskan E *et al.* **XIAP Expression Is an Independent Prognostic Marker in Clear-Cell Renal Carcinomas.** Human Pathology. 2004; 35(8): 1022-8

Ravaud A, Wallerand H, Culine S *et al.* **Update on the medical treatment of metastatic renal cell carcinoma**. European Urology. 2008; 54(2): 315-25

Reed JC, Doctor KS, Godzik A. **The domains of apoptosis: a genomics perspective**. Science Signaling STKE. 2004; 2004(239): re9

Reed JC. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. Nature Clinical Practice Oncology. 2006; 3(7): 388-98

Rettschlag J. Linksventrikuläre Expression verschiedener Housekeeping-Gene bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Medizinische Dissertation 2003. Humboldt-Universität Berlin.

Rini Bl. **VEGF-Targeted Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma.** The Oncologist. 2005; 10: 191-7

Rini BI, Campbell SC, Rathmell WK. **Renal cell carcinoma.** Current Opinion in Oncology. 2006; 18: 289-96

Rini Bl, Rathmell WK. **Biological Aspects and Binding Strategies of Vascular Endothelial Growth Factor in Renal Cell Carcinoma.** Clinical Cancer Research. 2007; 13(2 Suppl): 741s-746s

Rini BI, Rathmell WK, Godley P. **Renal Cell Carcinoma.** Current Opinion in Oncology. 2008; 20: 300-6

Rini BI, Campbell SC, Escudier B. **Renal cell carcinoma**. Lancet. 2009; 373(9669): 1119-32

Robson CJ. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. Journal of Urology. 1963; 89: 37-42

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the Road to Death's Door. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2002; 3: 401-10

Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS. **Mitochondria, Calcium, and Calpin are Key Mediators of Resveratrol-Induced Apoptosis in Breast Cancer**. Molecular Pharmacology. 2007; 72(6): 1466-75

Schlesinger-Raab A, Treiber U, Zaak D, Hölzel D, Engel J. **Metastatic renal cell carcinoma: results of a population-based study with 25 years follow-up**. European Journal of Cancer. 2008; 44(16): 2485-95

Sekimura A, Konishi A, Mizuno K *et al.* Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. Oncology Reports. 2004; 11(4): 797-802

Semenza GL. **Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis.** IUBMB Life. 2008; 60(9): 591-7

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. Annals of Surgical Oncology. 2008; 15(12): 3579-87

Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(9): 486-94

Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG *et al.* The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. The Journal of Cell Biology. 2002; 157(1): 115-24

Sohn DM, Kim SY, Baek MJ *et al.* Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2006; 60(6): 289-92

Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? Mol Cell. 2008; 30(2): 123-35

Sun Y, Peng ZL. **Programmed cell death and cancer.** Postgraduate Medical Journal. 2009; 85(1001): 134-40

Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R. **Mitochondrial** protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. Cell Death and Differentiation. 2004; 11(2): 208-16

Tomita Y. **Early renal cell cancer.** International Journal of Clinical Oncology. 2006; 11: 22-7

Tröger A, Siepermann M, Escherich G *et al.* **Survivin and its prognostic significance in pediatric acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia**. Haematologica. 2007; 92(8): 1043-50

Tunuguntla HSGR, Jorda M. Diagnostic and Prognostic Molecular Markers in Renal Cell Carcinoma. The Journal of Urology. 2008; 179: 2096-102

Twomey C, McCarthy JV. **Pathways of apoptosis and importance in development.**Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2005; 9(2): 345-59

Valasek MA, Repa JJ. **The power of real-time PCR.** Advances in Physioloy Education. 2005; 29: 151-9

Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. **The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview.** Cell Death & Differentiation. 2008; 15(3): 453-60

van Ginkel PR, Darjatmoko SR, Sareen D *et al.* **Resveratrol Inhibits Uveal Melanoma Tumor Growth via Early Mitochondrial Dysfunction.** Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2008; 49(4): 1299-306

van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. **Mitochondrial intermembrane proteins in cell death**. Biochemical and Biophysical Research Communication. 2003; 304(3): 487-97

van Loo G, van Gurp M, Depuydt B *et al.* **The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity.** Cell Death and Differentiation. 2002; 9(1): 20-6

Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. Apoptosis. 2002; 7(2): 163-6

Wang H, Xi X, Kong X, Huang G, Ge G. **The expression and significance of survivin mRNA in urinary bladder carcinomas.** Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2004; 130: 487-90

Wang Z, Cuddy M, Samuel T *et al.* **Cellular, Biochemical, and Genetic Analysis of Mechanism of Small Molecule IAP Inhibitors.** The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(46): 48168-76

Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. **Pathways to caspase activation.** Cell Biology International. 2005; 29: 489-96

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK *et al.* **tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c**. Genes and Development. 2000; 14(16): 2060-71

Weikert S, Christoph F, Schrader M *et al.* **Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis.** International Journal of Cancer. 2005; 116: 100-4

Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS. **Neutralization of Smac/Diablo by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)**. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(49): 51082-90

Wong WW, Puthalakath H. **Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway**. IUBMB Life. 2008; 60(6): 390-7

Xie W, Jiang P, Miao L *et al.* **Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1**. Nucleic Acids Research. 2006; 34(7): 2046-55

Yan Y, Mahotka C, Heikaus S *et al.* **Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas.** British Journal of Cancer. 2004; 91: 1349-57

Yan N, Shi Y. **Mechanisms of Apoptosis Through Structural Biology.** Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2005; 21: 35-56

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. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(17): 16963-70

Yang X, Xing H, Gao Q et al. Regulation of HtrA2/Omi by X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells. Gynecologic Oncology. 2005; 97(2): 413-21

Yoo NJ, Kim HS, Kim SY *et al.* Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. APMIS. 2003; 111(3): 382-8

Zamparese R, Pannone G, Santoro A *et al.* **Survivin expression in renal cell carcinoma**. Cancer Investigation. 2008; 26(9): 929-35

Zhao J, Jin J, Zhang X *et al.* Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo. Cancer Gene Therapy. 2006; 13(4): 420-7

Züllig S, Hengartner MO. Cell biology. **Tickling macrophages, a serious business**. Science. 2004; 304(5674): 1123-4

Dank

Für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation an seiner Klinik durchführen zu dürfen, möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Kurt Miller bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt sowohl Priv.-Doz. Dr. med. Steffen Weikert als auch Dr. med. Carsten Kempkensteffen für ihre konstruktive Kritik und sorgfältige Korrektur des Manuskripts. Beide haben bis zuletzt viel Geduld mit mir gezeigt.

Sehr herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Urologischen Forschungslabors des Campus Benjamin Franklin für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Anleitung im Labor bedanken:

Dr. rer. nat. Hans Krause war mir mit vielen wertvollen Hinweisen zu methodischen Fragen und der Beratung zur Durchführung der Experimente eine große Hilfe.

Frau Waltraut Jekabsons, Frau Petra von Kwiatkowski und Frau Antonia Maass haben mir jederzeit im Labor mit enormem Engagement zur Seite gestanden.

Darüber hinaus gilt ein großes Dankeschön meinem Vater Franck Micklisch, sowie Jörg Müller und Tom Franz, Katrin Rahmfeld und Elisabeth Blackstein sowie Helga und Peter Gebhardt, deren moralische Unterstützung und Ermutigung von großer Bedeutung war.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

"Ich, Karen Kadner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Expressionsprofil und prognostische Bedeutung der mitochondrialen IAP Antagonisten Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 im klarzelligen Nierenzellkarzinom

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."