

**Proteasom-Inhibition überwindet die Resistenz von
Nierenzellkarzinom-Zelllinien gegenüber PPAR γ -
Aktivierung.**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Karin von Schwarzenberg
aus Petare/Venezuela
vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2009

Tag der mündlichen Prüfung:

03.08.2009

Dekan:

Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	i
1. Einleitung	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom	1
1.1.1 Das klarzellige Nierenzellkarzinom.....	2
1.1.2 Das papilläre Nierenzellkarzinom.....	4
1.1.3 Das chromophobe Nierenzellkarzinom.....	4
1.1.4 Therapieansätze.....	4
1.2 Der Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor	6
1.2.1 PPAR γ	7
1.2.2 Liganden von PPAR γ	8
1.3 Das Proteasom	8
1.3.1 Der proteasomale Abbauweg.....	9
1.3.2 Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib	10
1.4 Das Endoplasmatische-Retikulum	11
1.4.1 Endoplasmatischer Stress.....	11
1.4.2 ER-Stress durch Troglitazone und Bortezomib	12
1.5 Zielsetzung	13
2. Material	14
2.1 Geräte.....	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Zelllinien.....	16
2.4 Reagenzien.....	16
2.4.1. Antikörper für Western Blot-Analyse	16
2.4.1.1 Unkonjugierte Antikörper	16
2.4.1.2 Konjugierte Zweitantikörper	17
2.4.2 Chemikalien	17
2.5 Oligodesoxyribonukleotide.....	19
2.6 Kits.....	19
2.7 Medien und Antibiotika.....	19
2.8 Puffer und Lösungen	20

3. Methoden	23
3.1 Zellbiologische Methoden	23
3.1.1 Zellkultivierung	23
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl	24
3.1.4 Durchflusszytometrie	24
3.1.4.1 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose	25
3.1.5 Bestimmung der Zytokinsekretion	25
3.1.6 Fluorimetrische Messung der Caspase-3 Aktivität	26
3.2 Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1 Kernextrakte	27
3.2.2 Zelllysate	27
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	28
3.2.4 SDS-PAGE	28
3.2.5 Western Blot	30
3.2.6 Stripping	32
3.2.7 Isolierung von RNA	32
3.2.8 Konzentrationsbestimmung von RNA	32
3.2.9 Polymerasenkettenreaktion (PCR)	33
3.2.9.1 Generierung von cDNA	33
3.2.9.2 PCR	33
3.2.10 Microarray-Analyse	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Vorarbeiten	35
4.2 Die Aktivierung von PPAR γ inhibiert die Sekretion von IL-6	36
4.3 Der Effekt von Troglitazone auf intrazelluläre Signalwege	37
4.3.1 Einfluss von Troglitazone auf den MAPK-Signalweg	38
4.3.3 Einfluss von Troglitazone auf den JAK/STAT-Signalweg	39
4.3.2 Einfluss von Troglitazone auf den PI3K/Akt-Signalweg	40
4.4 Der NF- κ B Signalweg wird durch Troglitazone inhibiert	42
4.5 PPAR γ -Aktivierung führt zu einer verminderten nukleären Expression von HIF1 α	43
4.6 Troglitazone induziert Apoptose in NZK-Zelllinien	44
4.7 Synergistische Effekte von Troglitazone und Bortezomib	49

4.8 PPAR γ -Aktivierung induziert endoplasmatischen Stress	53
5. Diskussion	55
6. Zusammenfassung.....	62
7. Literaturverzeichnis	63
8. Danksagungen.....	74
9. Lebenslauf	75
10. Publikationsliste.....	76

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AG	Arbeitsgruppe
AEP	Aminoendopeptidase
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF6	<i>Activating-Transcription-Factor-6</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl	<i>B-Cell-Lymphoma</i>
BiP	<i>Immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3- [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -l-Propansulfonsäure
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
dATP	Deoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Deoxy-Cytosintriphosphat
DEVD	N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp
dGTP	Desoxy-Guanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxy-Thymintriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 α	<i>eucaryotic translation initiation factor 2 alpha</i>
EGTA	Ethylen-Bis-(Oxyethylnitrilo)-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Association</i>
FITC	Fluorescein Isothiozyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>Forward scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonische Säure
HIF	<i>Hypoxia-Inducible-Factor</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
IRE-1	<i>Inositol-requiring 1</i>
JAK	Janus-Kinase
l	Liter
μ	mikro
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I (<i>Major Histocompatibility Complex-I</i>)
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Na-O-V	Natrium-Ortho-Vanadat
NF-κB	<i>Nuclear-Factor-kappa-B</i>
NKZ	Nierenzellkarzinom
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
p	piko

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP-1	Poly-[ADP-ribose]-Polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor</i>
PPRE	<i>Peroxisome-Proliferator-Response-Element</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RIPA	Radioimmun-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Sodium Dodecylsulphat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>Side scatter</i>)
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN-20 (<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>)
TGF	<i>Transforming-Growth-Factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGZ	Troglitazone
TNF	Tumornekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZD	Thiazolidinedione
U	Unit (Einheit)
UPR	<i>Unfolded-Protein-Response</i>

V	Volt
VEGF	<i>Vascular-Endothelial-Growth-Factor</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist der häufigste solide Tumor der menschlichen Niere und macht ungefähr 2% aller Krebsarten aus. Jährlich werden in den USA mehr als 35 000 neue Fälle diagnostiziert. Es tritt vorwiegend ab einem Alter von 50 Jahren auf und betrifft Männer häufiger als Frauen (Cohen and McGovern; 2005; McLaughlin and Lipworth; 2000). Es entsteht aus Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere und tritt in verschiedenen histologischen Untertypen auf. Es existiert das chromophobe, das chromophile und das klarzellige Nierenzellkarzinom, wobei das klarzellige Nierenzellkarzinom über 70% aller Erkrankungen ausmacht. Risikofaktoren sind unter anderem Rauchen, Übergewicht, Bluthochdruck oder genetische Faktoren wie die Von-Hippel-Lindau-Krankheit. Wenn der Tumor in einem frühen Stadium diagnostiziert wird hat die Nephrektomie gute Aussichten auf Heilung (Bukowski; 1997; Cohen and McGovern; 2005; McLaughlin and Lipworth; 2000; Stenzl and deKernion; 1989; Vogelzang and Stadler; 1998). Da es aber in frühen Stadien meistens keine typischen Symptome gibt und nur Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Müdigkeit oder Blut im Urin auftreten, wird der Tumor häufig zufällig bei allgemeinen Untersuchungen entdeckt. Bei den meisten neudiagnostizierten Patienten liegen deshalb schon Metastasen in anderen Organen vor. Hier müssen ausser der Nephrektomie noch andere Therapiearten angewendet werden. Patienten mit Metastasen haben eine sehr schlechte Prognose, da das Nierenzellkarzinom resistent gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie ist. Die gängigsten Therapien, die in letzter Zeit angewendet wurden, sind die Gabe von Zytokinen wie IL-2 oder IFN- α (Bukowski; 1997; Cohen and McGovern; 2005).

1.1.1 Das klarzellige Nierenzellkarzinom

Das klarzellige NZK ist mit über 70% das am häufigsten auftretende NZK und ist durch eine Mutation im Tumorsuppressorgen Von-Hippel-Lindau charakterisiert. Wenn diese Mutation vererbt wird, spricht man von der Von-Hippel-Lindau-Krankheit und fast 40% aller Patienten mit einer Mutation in diesem Gen entwickeln ein NZK. Die Von-Hippel-Lindau-Krankheit ist ein seltenes, autosomal dominantes Syndrom, dessen Folgen retinale Angiome, Pheokromocytome oder das klarzellige Nierenzellkarzinom sind (Pal et al; 1997). Bei dieser Erkrankung entsteht eine Mutation in der Keimbahn und somit wird ein defektes Allel vererbt. Wenn das zweite Wildtyp-Allel auch noch einen Funktionsverlust erfährt, kommt es zur Entstehung eines NZK. (Cohen and McGovern; 2005; Talks et al; 2000; Yao et al; 2002). Es gibt aber auch häufig Spontanmutationen im VHL-Gen, die zu einem NZK führen. Dies macht VHL zu einem wichtigen Faktor der NZK-Biologie. Das VHL-Gen gehört zur Klasse der E3 Ubiquitin Ligasen und wurde auf dem Chromosom 3p25 lokalisiert. VHL ist an dem gezielten Abbau des *Hypoxia-inducible-factor* (HIF) durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg beteiligt. Bei der Anwesenheit von Sauerstoff steuert VHL die Ubiquitinierung von HIF.

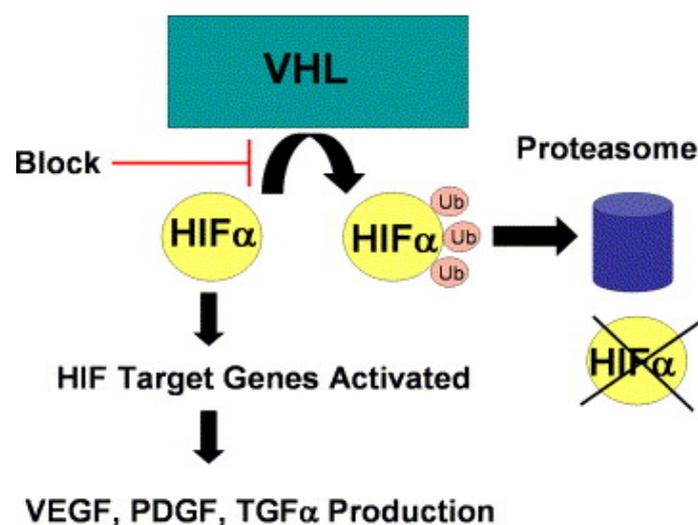


Abb.1: Übersicht über den HIF-Signalweg, aus: Larkin and Eisen, 2006, Crit Rev Oncol Hematol.

HIF ist ein Transkriptionsfaktor mit einem alpha/beta Heterodimer. Er besitzt eine DNA-Bindungsdomäne, die die Sauerstoff-abhängige Expression von Genen reguliert. Im Gegensatz zu HIF α wird HIF β konstitutiv exprimiert. HIF α ist die Komponente, die durch Sauerstoff reguliert wird und die Aktivität von HIF bestimmt (Harris; 2002; Iliopoulos et al; 1995; Ivan et al; 2001; Talks et al; 2000). HIF1 α akkumuliert im Zustand der Hypoxie oder in Zellen mit einer Fehlfunktion von VHL. Bei normaler Konzentration von Sauerstoff wird HIF1 α schnell durch VHL erkannt und mit Ubiquitin-Molekülen markiert. Bei Hypoxie ist HIF1 α vor Abbau geschützt und kann in den Kern gelangen, wo es bis zu 60 verschiedene Gene aktiviert (Abb. 1). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von zwei Prolinresten des HIF-Komplexes essentiell für die Bindung von HIF α an VHL ist (Harris; 2002; Ivan et al; 2001; Jaakkola et al; 2001). Dies führt zur Markierung von HIF1 α mit einer Ubiquitin-Kette und somit zum Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg. HIF spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Glucose-Stoffwechsels, der Angiogenese, des Zellzykluses oder der Erythropoese unter sauerstofflimitierenden Verhältnissen. Wichtige Gene, die in Folge einer HIF-Aktivierung exprimiert werden, sind unter anderem der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) oder der *Transforming Growth Factor* (TGF). Dies führt beim Nierenzellkarzinom zu einer unkontrollierten Angiogenese (Narravula and Colgan; 2001; Raval et al; 2005). Als Ergebnis von Hypoxie, die häufig in Tumoren vorherrscht, und Mutationen im VHL-Gen ist der HIF-Signalweg in vielen malignen Erkrankungen aktiv, wird in gesunden Geweben aber nicht exprimiert (Harris; 2002; Talks et al; 2000). Obwohl die Auslöser für das Nierenzellkarzinom vielfältig sein können ist eine Alteration in der Funktion von HIF eine auffällige Gemeinsamkeit. Vor kurzem wurden Stoffe, die die Interaktion von VEGF mit VEGFR blockieren in die Therapie des Nierenzellkarzinoms eingeführt. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib und der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacunib (Avastin) haben schon einige Erfolge bei der Therapie gezeigt.

1.1.2 Das papilläre Nierenzellkarzinom

Das sporadische papilläre NZK hat eine 5-Jahres Überlebenszeit von 90% und tritt 5 Mal häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Es metastasiert weniger häufig als das klarzellige NZK, die Überlebenschance für metastasierendes papilläres NZK ist allerdings noch schlechter als für das klarzellige NZK (Motzer et al; 2002). Eine vererbare Variante des papillären NZK kommt durch eine autosomal dominante Mutation auf Chromosom 7 zustande. Auf diesem Chromosom ist das Proto-Onkogen MET lokalisiert, eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die normalerweise durch den Hepatozyten-Wachstums-Faktor aktiviert wird. Im erblichen papillären NZK erfährt MET eine Autoaktivierung durch den Austausch von bestimmten Aminosäuren. Dadurch kommt es zu einer Duplikation des Chromosoms 7, was zu einer erhöhten Gendosis führt (Delahunt and Eble; 1997; Zhuang et al; 1998). Nur ein geringer Prozentsatz des sporadischen papillären NZK hat Mutationen im MET Onkogen, was die Pathogenese vom klarzelligen NZK unterscheidet. Außerdem sind für das papilläre NZK noch eine Trisomie des Chromosoms 17 und bei männlichen Patienten der Verlust des Y-Chromosoms charakteristisch.

1.1.3 Das chromophobe Nierenzellkarzinom

Das chromophobe NZK macht ungefähr 4% aller NZK aus und hat häufig einen benignen Ausgang nach einer Nephrektomie, wenn die Stufe und der Grad des Tumors günstig sind. Das chromophobe NZK entsteht aus Zellen des distalen Tubulus und zeichnet sich durch einen erheblichen Chromosomenverlust (-1, -3, -6, -10, -13, -17 -21) aus (Cheville et al; 2003; Speicher et al; 1994).

1.1.4 Therapieansätze

Da bei dem Nierenzellkarzinom nur geringe Symptome auftreten hat der Tumor bei Diagnose häufig schon metastasiert und eine Nephrektomie hat nur noch einen geringen Therapieerfolg.

Die bisher gängigste Therapie war eine Immuntherapie mit der Gabe von Zytokinen wie IL-2 und IFN- α . Bei Patienten mit positiven Risikofaktoren erlangt man hierbei eine Anspruchsrate von 10 - 20%. Bei Nichtansprechen liegt die Überlebensrate für 5 Jahre allerdings bei unter 10%. Wegen des geringen Ansprechens und der hohen Toxizität dieser Substanzen ist es wichtig neue Ansätze zu finden (Bukowski; 1997).

Da eine unkontrollierte Angiogenese ein häufig auftretendes Phänomen bei dem Nierenzellkarzinom ist, ist die Gabe von anti-VEGF Antikörpern wie Bevacizumab, das unter dem Handelsnamen Avastin seit Frühjahr 2005 von der *Food and Drug Association* (FDA) zugelassen ist, ein interessanter neuer Ansatz. Bevacizumab gilt als erste Wahl bei metastasierten kolorektalen Karzinomen in Kombination mit Folsäure und Irinotecan (Hebbar et al; 2009). Beim Nierenzellkarzinom ist es für die Kombinationstherapie mit IFN- α zugelassen (Bukowski; 2008). Es laufen noch zahlreiche weitere Studien, die die Wirksamkeit von Bevacizumab bei anderen Tumoren testen, wie z.B. eine Kombinationstherapie mit Cisplatin bei fortgeschrittenem Lungenkrebs (Escudier et al; 2008; Rini et al; 2008).

Eine weitere neue vielversprechende Methode, die seit kurzem für die Therapie des NZK zugelassen ist, ist die Gabe von Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Sorafenib (Nexavar, BAY 53-9006) oder Sunitinib (Sutent, SU11248). Sorafenib wurde im Dezember 2005 von der FDA für die Behandlung des fortgeschrittenen metastasierenden Nierenzellkarzinoms zugelassen und hemmt den Raf/MEK/ERK-Signalweg und Rezeptor-Tyrosinkinasen wie VEGF-Rezeptor-2 und -3, PDGF-Rezeptor- β , Flt3 und c-Kit. Dadurch kommt es zu einer verminderten Angiogenese und Proliferation des Tumors sowie der Induktion von Apoptose. Sunitinib hemmt im Gegensatz zu Sorafenib nur die VEGF-Rezeptoren 2 und 3, die PDGF-Rezeptoren α und β , den c-Kit-Rezeptor und Flt-3. In einer randomisierten Studie hat Sunitinib zu einer verbesserten Ansprechrate und des Gesamtüberlebens geführt und wurde in den USA und Europa als Erstlinien- und Zweitlinientherapie für das metastasierende NZK zugelassen (Grandinetti and Goldspiel; 2007; Hutson and Figlin; 2007; Panka et al; 2006).

1.2 Der Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor

Peroxisomen sind kleine, von einer Membran umhüllte Vesikel, in deren Innerem eine Vielzahl von Reaktionen ablaufen. Zu den Funktionen gehört unter anderem die Synthese von Glycerollipiden, die Synthese und der Abbau von Cholesterin oder die Oxidation von Fettsäuren. Die Entdeckung eines nukleären Rezeptors, der durch peroxisomale Proliferatoren aktiviert wird, hat interessante Einblicke in die molekularen Mechanismen und die Wirkungsweise ihrer pleiotropen Effekte bereitet (Demetri et al; 1999; Lazarow; 1987). Der Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor- γ (PPAR γ) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der Hormon-Rezeptor-Superfamilie gehört. Weitere Mitglieder dieser Familie sind Estrogen-, Thyroid-Hormon-Rezeptoren, Vitamin D3 oder Retinoid-X-Rezeptoren (Wang et al; 2006).

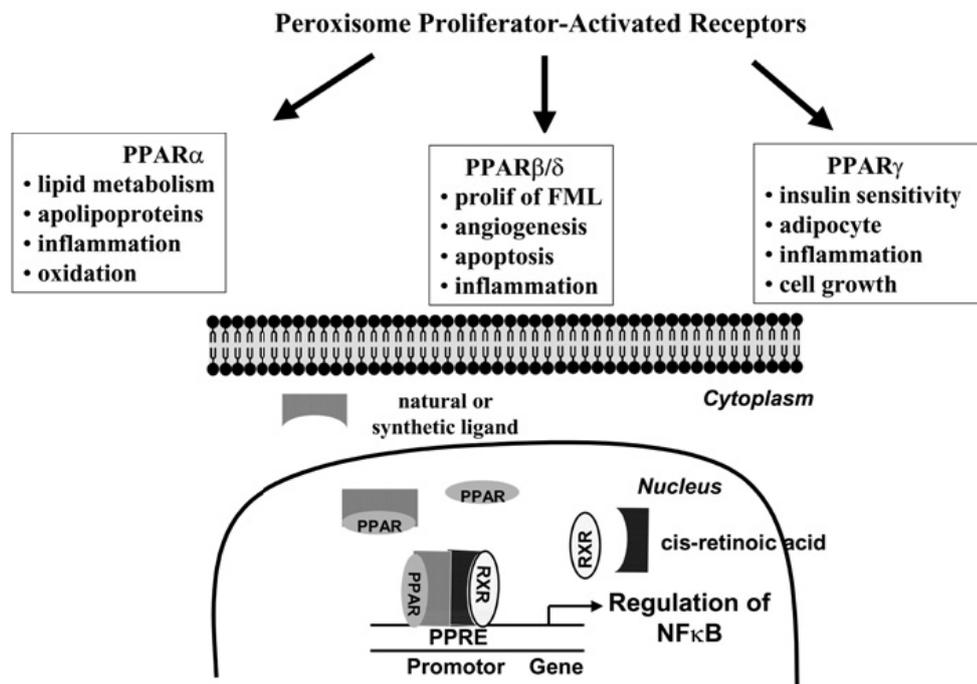


Abb. 2: Übersicht über die *Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors*, aus Bordet et al, 2006, Biochem Soc Trans.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Untertypen von PPAR (α , β/δ und γ) bekannt, die eine bestimmte Verteilung im Gewebe aufweisen. PPAR- α wird hauptsächlich in Hepatozyten, Kardiomyozyten, proximalen Tubuluszellen der Niere und Enterozyten exprimiert, wohingegen die Expression von PPAR- β/δ nicht so spezifisch ist und häufiger auftritt (Evans; 1988; Wang et al; 2006).

1.2.1 PPAR γ

PPAR γ ist der am besten charakterisierte Rezeptor und wird hauptsächlich in Fettgewebe exprimiert, wo er regulatorische Funktionen beim Glucose-Stoffwechsel, der Insulin-Sensitivierung, der Differenzierung von Adipozyten oder dem Fettstoffwechsel ausführt. Außerdem ist er für die Transkription von Adipozyten-spezifischen Genen verantwortlich (Abb. 2) (Evans; 1988).

Ausser seiner klassischen Rolle im Fettgewebe wurde gezeigt, dass er in geringem Maße auch noch in anderen Geweben wie z.B. in Brust, Darm, Niere oder in Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Dort wurde er mit verschiedensten physiologischen Prozessen und Aspekten der Zelle in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel die zelluläre Entwicklung, Differenzierung oder Apoptose (Chinetti et al; 1998; Koeffler; 2003; Mueller et al; 1998; Shimada et al; 2002).

Nach der Bindung eines Liganden heterodimerisiert PPAR γ mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bindet an spezielle PPAR-Response-Elemente (PPRE), die innerhalb des Promotors seiner Ziel-Gene liegen. PPAR γ besitzt spezielle DNA-Bindungsmotive. Diese Motive erkennen die spezifischen Nukleotid-Sequenzen der PPREs (Willson et al; 2000).

Ausser den Funktionen, die PPAR γ in normalen Geweben ausübt, haben verschiedene Studien gezeigt, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einem Wachstumsstopp, der Ausdifferenzierung und Apoptose in verschiedenen Tumoren wie Brustkrebs und Prostatakrebs führt (Koeffler; 2003; Mueller et al; 1998).

1.2.2 Liganden von PPAR γ

PPAR γ -Rezeptoren werden von verschiedenen lipophilen Liganden aktiviert, wie z.B. langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Eicosonoid-Derivate wie Prostaglandin-EJ₂, Komponenten von Fettsäure-Derivaten oder von oxidierten Low-density-Lipoproteinen (OxLDL). Prostaglandin-EJ₂ gilt als der potenteste natürlich vorkommende Ligand und ist auch der häufigste Aktivator von PPAR γ (Desvergne and Wahli; 1999; Nagy et al; 1998). Synthetische hoch-affine Liganden sind die Thiazolidinedione (TZD), eine Gruppe von hypoglykämischen Substanzen, die Hyperglykämie sowie Hyperinsulinämie in einem Insulin-resistenten Zustand reduzieren. Zu ihnen gehören Troglitazone, Rosiglitazone oder Pioglitazone. Ausser ihrer anti-diabetischen Wirkung zeigen TZDs anti-inflammatorische Effekte und sind von großem Interesse als mögliche anti-Tumor Agenzien, da sie zu einem Wachstumsstopp und Apoptoseinduktion einer großen Reihe von Tumoren führen (Koeffler; 2003; Mueller et al; 1998). Andere synthetische Substanzen, die als Liganden fungieren können, sind Ibuprofen, Indomethacin oder Fenoprofen (Demetri et al; 1999; Lehmann et al; 1995; Wang et al; 2006).

1.3 Das Proteasom

Das Proteasom ist ein multikatalytischer Protease-Komplex, der aus 28 Untereinheiten besteht. Diese Untereinheiten sind aus vier Ringen mit jeweils sieben Untereinheiten aufgebaut. Die beiden äußeren werden als α -Ringe, die beiden inneren als β -Ringe bezeichnet, wobei nur die β -Ringe proteolytische Aktivität besitzen (Ciechanover; 1993; Ciechanover; 1994).

Man unterscheidet zwischen dem konstitutiven 20S Proteasom und dem aktivierten 26S Proteasom. Das 20S Proteasom hat die Struktur eines Hohlzylinders deren β_1 , β_2 und β_7 Untereinheiten der beiden Ringe allerdings inaktiv sind.

Das Proteasom wird durch IFN- γ -Ausschüttung aktiviert, wobei die konstitutiven Untereinheiten durch die aktiven Untereinheiten LMP-2, LMP-7 und MECL ersetzt werden. Die drei aktiven Untereinheiten spalten Proteine nach bestimmten

Aminosäuren. Dabei schneidet die erste ähnlich wie Trypsin nach basischen, die zweite ähnlich wie Chymotrypsin nach großen, hydrophoben und die dritte wie eine Postglutamyl-Peptid-Hydrolase nach sauren Aminosäuren (Oberdorf et al; 2001).

Proteine, die mit einer Polyubiquitin-Kette markiert sind, werden durch das Proteasom degradiert. Das 26S Proteasom besitzt zwei 19S regulatorische Komplexe an beiden Enden, die Ubiquitin-markierte Proteine erkennen, sie binden und durch das Proteasom schleusen. Dabei werden diese Proteine zu Oligopeptiden aus 3-23 Aminosäuren degradiert.

1.3.1 Der proteasomale Abbauweg

In einer Zelle werden kontinuierlich neue Proteine synthetisiert. Daher müssen andere wieder abgebaut werden, um die Homöostase aufrechtzuerhalten. In eukaryotischen Zellen werden die meisten Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut.

In diesem Komplex werden nicht nur kurzlebige Proteine degradiert, sondern auch Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren, Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorgene, Onkogene, Signalmoleküle oder auch inhibitorische Moleküle (Adams et al; 2000; Wu; 2002). Das Proteasom ist außerdem wichtig, um falsch gefaltete oder beschädigte Proteine abzubauen, und entscheidend für die Antigenprozessierung des MHC-I-Weges. Das Proteasom ist somit an der Regulation der Proliferation, der Differenzierung und des Überlebens der Zelle beteiligt.

Damit Proteine abgebaut werden können, müssen sie durch Ubiquitin-Moleküle markiert werden. Ubiquitin-Moleküle sind kleine Moleküle, die Multimere bilden können. Die Markierung geschieht in einem Prozess, an dem 3 Enzyme beteiligt sind. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) katalysiert die Aktivierung der C-terminalen Karboxygruppe durch die Bildung einer Thioesterbindung. Durch diese Bindung kann das zweite wichtige Enzym, das Ubiquitin-conjugierende Enzym (E2), mehrere Ubiquitin-Moleküle verbinden. Das letzte Enzym, die Ubiquitin Ligase (E3), verbindet die Ubiquitin-Kette mit dem zu degradierenden

Protein, wobei sie ein Ubiquitin-Molekül über einen Glycin-Rest an einen Lysin-Rest des Proteins bindet (Adams et al; 2000; Hershko; 2005).

Nachdem die Proteine einen Polyubiquitin-Schwanz bekommen haben, werden sie vom 19S regulatorischen Komplex erkannt und dort unter ATP-Verbrauch denaturiert und danach in das Proteasom befördert und degradiert.

1.3.2 Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib

Bortezomib, N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leucin-Boronsäure, das früher PS-431 genannt wurde, ist ein Boronsäuredipeptid. Adams et al. haben 1998 die Synthese mehrere Boronsäure-Verbindungen beschrieben, von denen sich Bortezomib am effektivsten erwiesen hat (Adams; 2002).

Bortezomib inhibiert das Proteasom sehr spezifisch und reversibel, indem es an die Chymotrypsin-ähnliche Untereinheit bindet und diese blockiert. Bortezomib ist wirksamer als andere Proteasom-Inhibitoren und bindet mit einer hohen Affinität an das Proteasom (Adams et al; 1998).

In Tiermodellen wurde festgestellt, dass es nicht in die immunprivilegierten Regionen wie Gehirn, Augen und Testes gelangt.

Bereits eine geringe Konzentration von Bortezomib, weniger als 10 nmol/L, genügt, um eine Inhibition des Proteasoms zu erreichen. Außerdem ist die Plasmahalbwertszeit sehr gering (Rajkumar et al; 2005).

Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von Bortezomib Zytotoxizität, Wachstumsinhibition und Apoptose induziert (Teicher et al; 1999).

Bortezomib ist der erste Proteasom-Inhibitor, der von der amerikanischen *Food and Drug Association* für die Therapie von Patienten mit Multiplem Myelom (MM), bei denen mindestens zwei vorangegangene Therapien fehlgeschlagen haben, zugelassen wurde (Richardson et al; 2003). Außerdem gibt es bereits erste Studien, die zeigen, dass auch Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, ALL oder soliden Tumoren von einer Therapie mit Proteasom-Inhibitoren profitieren können (Cortes et al; 2004; Kondagunta et al; 2004; Papandreou and Logothetis; 2004).

1.4 Das Endoplasmatische-Retikulum

Eine Gemeinsamkeit der Proteasom-Inhibition und der PPAR γ -Aktivierung ist die Auslösung von endoplasmatischem Stress. Das endoplasmatische Retikulum ist der Ort, an dem die Synthese von sekretorischen Proteinen, die finale Proteinfaltung und die Kontrolle für korrekt gefaltete Proteine stattfindet. Proteine, die dafür bestimmt sind, in irgendeiner Weise in den sekretorische Signalweg einzugreifen, werden in Sec61 Translokons genannten Vesikeln durch die Membran transportiert und von Chaperonen auf ihre richtige Faltung kontrolliert. Nur Proteine, die diese Prüfung bestehen, dürfen das ER in COPII Vesikeln verlassen. Alle anderen werden durch Sec11 Kanäle ins Zytosol transportiert, mit Ubiquitin-Molekülen markiert und durch das Proteasom abgebaut (Robson and Collinson; 2006; Watson and Stephens; 2005).

Situationen, die zu einer Anhäufung von falsch gefalteten Proteinen oder einer anderen Störung in der ER-Homöostase beitragen, führen zur Auslösung von endoplasmatischem Stress.

1.4.1 Endoplasmatischer Stress

Die Störung der Calcium-Homöostase, die Inhibition der Protein-Glycosylierung, eine Schädigung der DNA oder die Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen können im Endoplasmatischen Retikulum eine Stress-Reaktion auslösen, die die Funktion des ER aber nicht ausser Kraft setzt. Diese sehr stark konservierte Reaktion, die schon in Hefen zu beobachten ist, wird als *Unfolded-Protein-Response* (UPR) bezeichnet. Die Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen wird durch verschiedene Substanzen verursacht, wie z.B Tunicamycin, das die Glycosylierung von Proteinen unterbindet, Brefeldin A, das den Protein-Transport zwischen ER und Golgi-Apparat inhibiert, DTT, das die Bildung von Disulfid-Brücken verschlechtert, oder andere Zellgifte. Thapsigargin kann auch ER-Stress auslösen, indem es die sarkoplasmatische/endoplasmatische CA^{2+} -ATPase inhibiert, was zu einer Störung der ER-Calcium-Homöostase führt. Die wichtigsten drei Effekte der UPR ist die Translationsrate zu vermindern, die Induktion der Transkription von ER-Chaperonen und Stress-Proteinen und die Beseitigung der

falsch gefalteten Proteine durch retrograden Transport oder Abbau durch das Proteasom (Egger et al; 2007; Lai et al; 2007; Morris et al; 1997; Nawrocki et al; 2005; Rao et al; 2001).

Um diese Ziele zu erreichen, werden ER-spezifische Signalwege aktiviert: PERK, ATF6 und IRE1.

In ungestressten Zellen bildet das ER-Chaperon BiP einen stabilen Komplex mit IRE1. Wenn Proteine, das eigentliche Substrat von BiP, sich nicht korrekt falten, konkurrieren falsch gefaltete Proteine mit IRE1 um BiP und es werden immer mehr Chaperone von IRE1 abgezogen. Dadurch kommt es zu einer Oligomerisierung von IRE1, einer anschließenden auto-Phosphorylierung und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hsc1, der zur Transkription von Genen führt, die den proteosomalen Abbau beschleunigen.

Der zytosolische Teil des transmembranen Transkriptionfaktor ATF6 wird im Zuge der UPR abgespalten, migriert in den Nukleus und aktiviert Gene für ER-spezifische Chaperone wie BiP oder Chop.

Das dritte Protein, die transmembrane ER-Kinase PERK wird in nicht gestressten Zellen auch durch die Bindung von BiP inaktiv gehalten. Bei Aktivierung phosphoryliert PERK eIF-2 α , welches in phosphoryliertem Zustand nicht in der Lage ist die Translation zu initiieren, was zu einem globalen Translationsstopp führt (Lai et al; 2007; Morris et al; 1997; Oh and Lim; 2009).

Wenn die Zellen zu stark beschädigt sind und die zytoprotektiven Mechanismen der UPR nicht mehr greifen, leitet die Zelle eine ER-Stress vermittelte Apoptose ein. Diese läuft über die Aktivierung der ER-spezifischen Caspase-4 und des Chaperons CHOP ab (Egger et al; 2007; Lai et al; 2007; Nawrocki et al; 2005).

1.4.2 ER-Stress durch Troglitazone und Bortezomib

Bortezomib inhibiert das Proteasom und somit einen wichtigen Faktor der zytoprotektiven Mechanismen der UPR. Durch die Proteasom-Inhibition können falsch gefaltete Proteine nicht mehr abgebaut werden und es kommt zu einer Akkumulation. Das führt dazu, dass die zytoprotektiven Mechanismen der UPR nicht mehr greifen und die Zelle somit eine ER-vermittelte Apoptose einleitet (Nawrocki et al; 2005).

PPAR γ -Liganden induzieren ER-Stress, indem sie die UPR aktivieren. Durch verschiedene PPAR γ -Liganden wird die Expression von UPR-regulierten Proteinen wie BiP, CHOP oder Hsp50 hochreguliert und die Phosphorylierung von eIF-2 α eingeleitet, was zu einem Translationsstopp führt (Weber et al; 2004).

1.5 Zielsetzung

Das Nierenzellkarzinom ist der dritthäufigste urologische Tumor mit jährlich etwa 12000 Neuerkrankungen in Deutschland. Er ist resistent gegenüber Chemo- und Strahlentherapie und obwohl es in den letzten Jahren immer wieder neue Therapieansätze gegeben hat, ist die Prognose beim metastasierenden NZK immer noch sehr schlecht. Bei der Untersuchung von Tumorproben von Nierenzellkarzinompatienten wurde entdeckt, dass PPAR γ in den meisten Proben überexprimiert war. Es gibt schon einige Studien, die besagen, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einem Wachstumsstopp und der Apoptoseinduktion von verschiedenen Tumoren führt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen des PPAR γ -Agonisten Troglitazone auf die drei unterschiedlichen Nierenzellkarzinomlinien A498, CAKI-2 und MZ1774. Es wurde ermittelt, ob Troglitazone Einfluss auf die Zytokinsekretion, die Signaltransduktion oder Apoptoseinduktion hat. Außerdem sollte untersucht werden, ob die kombinierte Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib die Wirkung von PPAR γ verstärken kann. Schon in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Tumorzellen sensitiver auf die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib reagieren als normale Zellen. Über die genauen biochemischen Abläufe ist allerdings noch wenig bekannt.

Die Kombination von Troglitazone und Bortezomib könnte somit ein wichtiger neuer Ansatz in der Therapie des behandlungsresistenten metastasierenden Nierenzellkarzinom sein.

2. Material

2.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Autoklav: Varioklav® Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Reader (SLT Rainbow)	Tecan GmbH, Crailsheim
Geldokumentationssystem BioDoc Analyse	Biometra, Göttingen
Lichtmikroskop: Olympus CK 30-F200	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
MiniProtean III Elektrophoresekammern	BioRad Laboratories GmbH, München
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Power Supply EPS 301	GE Healthcare Freiburg
Power Supply EPS 601	GE Healthcare, Freiburg
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Schwenktisch	Neolab, Heidelberg
Sicherheitswerkbank HS18/2	Kendro, Langenselbold
Spektralphotometer GeneQuant II	GE Healthcare, Freiburg
Wasserbad	Memmert GmbH+Co.KG Schwabach
Zellkultur-Brutschrank	NuAire, Inc., Plymouth, USA
Zentrifugen:	
Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products, Hanau
Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Combitips plus, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritze	Braun, Melsungen
Kodak Biomax Light Film 13x18cm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioSciences GmbH, Dassel
NUNC Cryo Tube Vials	
1 ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA
1,8 ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Peha-Soft Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidelberg
Pipetten	Corning Inc., Corning, New York, USA
Pipettenspitzen	Greiner, BioOne GmbH, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen Falcon®, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
PP-Test Tube Cellstar®, steril, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5 ml, steril, 12 x 75 mm	BD Biosciences, Heidelberg
Stericup™, 0,22 µm, 500 ml, steril	Millipore, Bedford, USA
Sterilfilter Minisart, 0,2 µM, steril	Satorius, Göttingen
TC-Tube Cellstar®, steril, 14 ml, 16,0/100 mm Screw Cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Well-Flachbodenplatte Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well-Rundbodenplatte Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
X-Ray Cassette	Gollwitzer GmbH & Co KG, Augsburg
Whatman-Papier	BioRad Laboratories GmbH, München

Material

Zellkulturflaschen

0.2 μm *Vented Blue Plug Se Cap*, BD Biosciences, Heidelberg
75 cm², 250 ml

0.2 μm *Vented Blue Plug Seal Cap*, BD Biosciences, Heidelberg
25 cm², 70 ml

2.3 Zelllinien

Name	Ursprung
A498	Giard et al., J Natl Cancer Inst 51: 1417-1423 (1973)
CAKI-2	Fogh et al., J Natl Cancer Inst 58: 209-214 (1977) Fogh et al., J Natl Cancer Inst 59: 221-226 (1977)
MZ1774	Barbara Seliger, Universität Mainz

2.4 Reagenzien

2.4.1. Antikörper für Western Blot-Analyse

2.4.1.1 Unkonjugierte Antikörper

Produkt	Hersteller
Ziege anti-Aktin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Kaninchen anti-Bcl-x	BD Biosciences, Heidelberg
Maus anti-BiP/GRP78	BD Biosciences, Heidelberg
Maus anti-Caspase-3/ CPP32	BD Biosciences, Heidelberg
Maus anti-Caspase-4	Assay designs, Hamburg
Kaninchen anti-pERK1/2	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt
Kaninchen anti-ERK1/2	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt

Maus anti-GAPDH	HyTest, Turku, Finnland
Maus anti-HIF1 α	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen anti-pJAK1	Upstate, Schwalbach
Maus anti-Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Kaninchen anti-mTor	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt
Kaninchen anti-pmTOR	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt
Maus anti-PARP-1	Alexis Biochemicals, Grünberg
Maus anti-PPAR γ	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Maus anti-PTEN	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen anti-relB	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Maus anti-STAT3	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt
Maus anti-pSTAT3	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt
Maus anti-Survivin	R&D Systems, Wiesbaden

2.4.1.2 Konjugierte Zweitantikörper

Produkt	Hersteller
Kaninchen anti-Ziege-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Ziege anti-Hase-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Ziege anti-Maus-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

2.4.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, St. Louis, USA

<i>Bench Mark™ Prestained Protein Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Biotinylated SDS PAGE Standards Low Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Albrich, Deisenhofen
Bortezomib	Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen
BSA	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
DEVD-AMC	Alexis Biochemicals, Grünberg
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA, 0,5 M	Sigma, St. Louis, USA
EGTA	Sigma, St. Louis, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GW9662	Calbiochem, Schwalbach
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis, USA
Marker für SDS-PAGE, <i>Broad Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München
Natrium-Ortho-Vanadat	Sigma, St. Louis, USA
PMSF	Sigma, St. Louis, USA
Propidiumiodid	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden
<i>Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate</i>	Amersham Life Science, Freiburg,
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Troglitazone	Sigma, St. Louis, USA
Tunicamycin	Biomol, Hamburg
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
TWEEN® 20	Merck, Hohenbrunn

2.5 Oligodesoxyribonukleotide

Sämtliche Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Biomers, Ulm bezogen.

HIF1alphaF	5'-gaaagcgcaagtccaag
HIF1alphaR	5'-tgggtaggagatggagatgc
β2-MikroglobulinF	5'-gggtttcatccatccgacat
β2-MikroglobulinR	5'-gatgctgcttacatgtctcga

2.6 Kits

Produkt	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Peribo Science, Bonn
ECL® Western Blotting Detection Reagent Kit	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Immunotech ELISA Kit	Beckmann Coulter™, Krefeld
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Medien und Antibiotika

Die Medien RPMI 1640 mit Glutamax-I mit Natriumpyruvat, Pyridoxin und 1000 mg/l Glucose, die Antibiotika Penicillin/Streptomycin, das verwendete PBS sowie das eingesetzte FCS wurden von der Firma Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

Medium	Zusammensetzung
RP10 Medium	Medium RPMI mit Glutamax-I 10% hitzeinaktiviertes FCS 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin

2.8 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
SDS-Probenpuffer für PAGE, 3-fach	0,18 M Tris-HCl pH 6,8 28% Glycerin 0,001% Bromphenolblau 6% SDS
Lysepuffer RIPA	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 2mM EDTA 2 mg/l Aprotinin 1mM PMSF in PBS
Puffer A Kernextrakte	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA

Material

	1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Puffer C Kernextrakte	20 mM HEPES pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Stripping Puffer	100 mM β -Mercaptoethanol 2% SDS 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7
TAE	40 mM Tris 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
TBS	10 mM Tris/HCl pH 8,0 140 mM NaCl
TBST 0,5%	140 mM NaCl 0,5% (v/v) Tween-20 10 mM Tris/HCl pH 8,0
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris/HCl pH 8,8 0,1% SDS 20% (v/v) Methanol

Material

2 x Rx-Mix für Caspaseaktivitätstest	100 mM HEPES 200 mM NaCl 20% Sucrose 0,2% CHAPS 4 mM CaCl ₂
Gebrauchslösung für Caspaseaktivitätstest (Rx-mix)	2 x Rx-mix 13 mM DTT 70 µM Ac-DEVD-AMC in H ₂ O (1:1)
Propidiumjodid-Lösung für Apoptosemessung nach Nicoletti	0,1% Triton-X + 0,1% Na-Citrat + 0,01% PI-Lösung

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultivierung

Die Tumorzelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 wurden in RP-10 Medium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 3×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen mit 175 cm² Bodenfläche ausgesät und mit ca. 20 ml Medium kultiviert. Alle 2 – 3 Tage wurden sie subkultiviert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellkulturflasche mit ca. 10 ml PBS gespült und die adhärennten Zellen mit 2,5 ml Trypsin vom Boden gelöst. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von RP-10 Medium gestoppt und die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in der log-Phase des Wachstums geerntet, gewaschen und in einer Konzentration von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) aufgenommen. In Aliquots zu je 1 ml wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und bei – 80 °C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension zügig erwärmt und sofort in vorgewärmtes Medium überführt wurden. Nach zweimaligem Waschen in PBS, wurden die Zellen in 10 ml RP-10 Medium in 75 cm² Kulturflaschen eingesät und in den folgenden Tagen regelmäßig die Vitalität kontrolliert. Bei gutem Zellwachstum wurden die Zellen in 175 cm² Kulturflaschen überführt.

3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Zellzahl einer Probe zu bestimmen wurden 10 µl der Zellsuspension und 90 µl Trypanblau gemischt und 10 µl dieser Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. Da Trypanblau die Zellwand von lebenden Zellen nicht durchdringen kann, wurden nur die toten Zellen blau angefärbt.

Es wurden 2 Großquadrate ausgezählt, davon der Mittelwert errechnet und anschließend die Zellzahl ermittelt:

(Mittelwert der Zellzahl aus 2 Großquadraten) $\times 10^4 \times 10$ Zellen/ml

Der Faktor 10 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau.

3.1.4 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können physikalische und nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen auch antigene und biochemische Eigenschaften von Zellen, DNA oder auch anderen Partikeln detektiert und quantifiziert werden. Die Partikel werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom der Durchflusskammer zugeführt, welche einen 488 nm Argon-Laser und einen 635 nm Dioden-Laser enthält. Die Detektion erfolgt zum einen Anhand des Streulichts, welches Rückschlüsse über die Größe und Granularität der gemessenen Partikel zulässt. Zum anderen wird nach dem Prinzip der angeregten Emission detektiert: Tritt ein mit Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnetes Teilchen in den Laserstrahl ein, so wird dieser Farbstoff angeregt und strahlt ein Emissionsspektrum mit einem charakteristischen Maximum aus. Für Fluoreszenzfarbstoffe, die im Fluoreszenzkanal 1 detektiert werden, wie beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) liegt das Emissionsmaximum bei 530 nm. In Kanal 2 liegt das Emissionsmaximum proportional zur Farbintensität zu Phycoerythrin (PE) und Propidiumiodid bei 585 nm. In dieser Arbeit wurden ein FACSCalibur™ und ein Durchflusszytometer von Beckman Coulter verwendet.

3.1.4.1 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose

Die Apoptoserate von Zellen nach Inkubation mit Troglitazone oder Bortezomib wurde durch die Messung der DNA-Fragmentierung mit der Methode nach Nicoletti et al. Bestimmt (Nicoletti et al; 1991). Hierbei werden die Zellen in einem hypotonen Puffer lysiert und durch die Interkalation des im Puffer enthaltenen Propidiumiodids in die DANN, können die freigesetzten Nuklei durchflusszytometrisch analysiert werden. Während der Apoptose spalten spezifische Endonukleasen, die sog. Caspasen, die DNA in oligonukleosomale Einheiten. Im Histogramm erscheinen die Zellkerne dieser Zellen mit fragmentierter, hypodiploider DNA links des 2N Peaks, welcher Zellen mit diploidem Chromosomensatz enthält.

3.1.5 Bestimmung der Zytokinsekretion

Um die Sekretion des Zytokins IL-6 in den Überstand der Zellkultur zu messen, wurden kommerziell erhältliche ELISAs verwendet und nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Zur Bestimmung der IL-6 Konzentration wurden Überstände der Zellkultur verwendet, durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) von zellulärem Material befreit und für ELISAs verwendet.

Jeweils 100 µl Zellkulturüberstand oder Kalibrierlösung und 100 µL Streptavidin-HRP Konjugat wurden pro Kavität einer ELISA-Platte eingesetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die Kavitäten wurden im Folgenden mit jeweils 200 µl Substratlösung versetzt und für 30 min im Dunkeln auf dem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 µl einer Stopplösung beendet und die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.1.6 Fluorimetrische Messung der Caspase-3 Aktivität

Bei apoptotischen Zellen spalten Endonukleasen, insbesondere die Caspase-3, die DNA in oligonukleosomale Einheiten. Hierbei ist die Aktivität der Caspase-3 im Vergleich zu vitalen Zellen erhöht und wurde mit Hilfe eines Caspase-3-Aktivitätsassay gemessen.

Die Aktivität der Caspase-3 wurde in Zelllysaten, durch die Spaltung des fluorogenen Caspase-Substrats DEVD-AMC (N-azetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylkumarin) bestimmt. Dazu wurden die Zellen in einem Puffer lysiert der 0.5% NP-40, 20 mM HEPES pH 7.4, 84 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM phenylmethyldisulfonil Fluorid (PMSF) enthielt. 20 µg des Zelllysats wurde dann mit RIPA-Puffer auf 50 µl aufgefüllt. Daraufhin wurden das Lysat in eine 96-Kavitäten-Platte gegeben und mit 150 µl eines Puffers (37.5 mM HEPES pH 7.3, 75 mM NaCl, 7.5% Sucrose, 0.075% CHAPS und 10 mM DTT) der 50 µM des DEVD-AMC Substrats enthielt auf 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die 96-Kavitäten-Platte für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Abgabe von Aminomethylkumarin wurde daraufhin in einer zweistündigen Kinetik bei einer Excitation von 360 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kernextrakte

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Es wurden genau 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden in 400 μl eines hypotonen Lysepuffers überführt und 15 min auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubationszeit gab man jeweils 25 μl IGEPAL zu den Proben, was dazu führte, dass die Zellen aufplatzten. Da IGEPAL auch die Proteine schädigt, wurden die Proben schnell für 10 s gevortext und dann 30 s bei 20000 x g und 4° C zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μl Puffer C aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Danach inkubierte man die Proben 15 min auf Eis wobei sie mehrfach gevortext wurden, damit sich das Pellet vollständig auflöst.

Als letztes wurden die Proben 5 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich jetzt die solubilisierten Kernproteine befanden, wurde dann in Eppendorf-Gefäßen bei -80°C gelagert.

3.2.2 Zelllysate

Zum Herstellen von Zelllysaten wurden die Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und ca. 1×10^6 Zellen verwendet.

Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 80 – 100 μl eines detergenzhaltigen Puffers durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und anschließender Inkubation für 30 min auf Eis.

Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Danach nahm man den Überstand der das Zelllysate enthielt ab, überführte ihn in Kryoröhrchen und lagerte ihn bei -80°C .

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nahm man 5 µl des Zelllysats ab und verdünnte es mit 20 µl RIPA-Puffer. Das Gemisch wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde mit Reagenzien des *BCA Protein Assays* von Pierce durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} durch bestimmte Aminosäuren im alkalischen Milieu zu Cu^{1+} reduziert wird, das mit Bicinchoninsäure (BCA) einen wasserlöslichen violetten Farbkomplex bildet. Die Absorption dieses Komplexes konnte bei 562 nm im Photometer quantifiziert werden. Anhand einer Standardreihe aus Rinderserumalbumin Fraktion V in Konzentrationen zwischen 0,09 mg/ml und 2 mg/ml, aufgelöst in RIPA-Puffer, kann die Proteinkonzentration bestimmt werden. Dazu verwendete man 1:5 in RIPA verdünntes Proteinlysate von dem in Doppelbestimmungen jeweils 10 µl in eine 96-Kavitäten-Flachbodenplatte pipettiert wurden. Um bei der Auswertung den Messfehler zu berechnen, wurde als negativ-Kontrolle reiner RIPA Puffer in die Kavitäten pipettiert. Dazu gab man in jede Kavität 200 µl der Reagenzlösung BCA (Reagenz A + Reagenz B 50:1)

Die 96-Kavitäten-Platte wurde daraufhin 30 min bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Absorption von 562 nm gemessen. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt mit deren Hilfe die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte.

3.2.4 SDS-PAGE

Um Proteine anhand ihrer molekularen Masse über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufzutrennen, wurden sie durch Inkubation mit dem negativ geladenen Detergenz SDS denaturiert. Dies führt zur Auflösung nicht-kovalenter Proteinaggregate und zur Maskierung der Eigenladung der Proteine, so dass sie sich im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe bewegen. Durch den Vergleich

mit einem Proteingemisch bekannter molekularer Massen, lassen sich im anschließenden Western Blot die unterschiedlichen Proteine aus Gesamtzelllysaten oder Kernextrakten identifizieren.

Die Proteinlösungen wurden in denaturierenden diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden in Gießkammern der Firma BioRad nach Anleitung des Herstellers gegossen. Die Gele wurden in 2 aufeinander folgenden Schritten hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, das je nach Fragestellung einen Acrylamidanteil von 6 – 12% hatte. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1:

Acrylamid Konzentration	6%	10%	12%
Bestandteile			
H ₂ O	6 ml	4,2 ml	3,2 ml
1M Tris ph 8,8	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml
30 % Acrylamid	3,2 ml	5 ml	6 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Nach erfolgter Polymerisation, wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Dieses besaß eine Zusammensetzung wie in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2:

Acrylamid Konzentration	6%
-------------------------	----

Bestandteile	
H ₂ O	3 ml
1M Tris ph 6,7	1 ml
30 % Acrylamid	1 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Beide Gelteile ermöglichen ein Auftrennen der Proteinlösung nach dem Prinzip der Isotachophorese.

Bei den Zelllysaten wurden jeweils 20 µg Protein und bei den Kernextrakten 16 µl Probe, mit einem Drittel des Volumens an Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 100 °C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT), hat zur Folge, dass die Disulfidbrücken der Proteine aufgespaltet werden, wodurch die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen werden. Bei Western Blots mit nativen Proteinen wird kein DTT verwendet, da die Antikörper ihr Antigen sonst nicht erkennen.

Nach Auftragen der Proben in die Taschen des Minigels erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V.

3.2.5 Western Blot

Zur Detektion der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde im Anschluss eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Nach dem Gellauf wurden die

aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um einzelne Proteinbanden mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen.

Der Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran erfolgte in Apparaturen der Firma BioRad. Dazu wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese mit einer in Transferpuffer äquilibrierten Nitrozellulosemembran bedeckt und von Whatmen-Papieren und Blotting-Schwämmen umschlossen. Dieses Konstrukt überführte man in eine Transfer-Kammer, die mit Transfer-Puffer aufgefüllt wurde.

Der Transferprozess erfolgte im Nassblottverfahren bei konstanten 250 mA und bei 4°C für ca. 1 Stunde.

Anschließend wurde die Membran kurz mit 1 x TBS gewaschen und daraufhin in Slimfast 4 %, 0,5 % TBST überführt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die Membran mit Protein abzusättigen und somit unspezifische Antikörper-Bindungen zu unterdrücken.

Danach wurde die Membran mit verschiedenen Erst-Antikörpern in 2,5 % Slimfast, 0,5 % TBST über Nacht bei 4°C, oder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden die Konzentrationsangaben des Herstellers berücksichtigt.

Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss 3x 5 min. mit TBST 0,5% gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper in 2,5 % Slimfast, 0,5 % TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Sekundär-Antikörper wurden nach Angabe des Herstellers verdünnt. Nach Inkubation wurde die Nitrozellulosemembran 2x in TBST 0,5% und 2x in TBS gewaschen. Die Detektion des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte mit dem ECL-Kit von GE Healthcare. Bei diesem Detektionssystem entsteht durch die HRP-katalysierte Oxidation von Luminol mit Wasserstoffperoxid Chemilumineszenz.

Entsprechend den experimentellen Vorgaben wurden 1 ml ECL-Lösung 1 und 1 ml ECL-Lösung 2 gemischt. Die Nitrozellulosemembran wurde 1 min in diesem Gemisch inkubiert und überschüssige Flüssigkeit auf einem Whatmen-Papier abgetropft. Daraufhin wurde die Membran in Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette fixiert. Je nach Antikörper wurden Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiten exponiert und anschließend entwickelt.

Die Membranen wurden nach der Exposition in Folie eingeschlagen bei 4 °C gelagert.

3.2.6 Stripping

Um die Nitrozellulosemembranen mehrfach verwenden zu können, konnte man die an die Proteine gebundenen Antikörper von der Membran entfernen und die Membran mit einem anderen Erst-Antikörper inkubieren.

Dazu inkubierte man die Membran 3x 10 min bei 70°C in Stripping-Puffer. Dieser enthielt beta-Mercaptoethanol, das für das Lösen der Antikörper von der Membran verantwortlich ist.

Danach wurde die Membran 5x 10 min in TBST 0,5% gewaschen, um sämtliches beta-Mercaptoethanol zu entfernen und die Membran danach erneut 1 Stunde bei RT geblockt.

3.2.7 Isolierung von RNA

Gesamt-Zell RNA wurde mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. 1×10^6 Zellen wurden mit 600 µl eines 100:1 RLT-Puffer/Mercapthoethanol Gemisch lysiert, mit 600 µl Ethanol versetzt und gründlich resuspendiert. Danach wurde das Zellysate auf eine Anionenaustauschsäule pipettiert und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Dies diente dazu, die RNA an die Säule zu binden und gleichzeitig andere Zellbestandteile abzutrennen. Daraufhin wurde die Säule einmal mit 700 µl RW1 Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (Zentrifugation 15 s bzw. 2 min bei 8000 x g). Die gereinigte RNA wurde mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert (Zentrifugation: 1 min bei 8000 x g) und bis zu dem späteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

3.2.8 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde durch Extinktionsmessung im Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurden die Extinktionen bei 250 nm und 280 nm ermittelt. Zur Berechnung der Konzentrationen nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz wurden die Extinktionswerte bei 260 nm sowie die Absorptionsrate von

RNA ($1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$ RNA) verwendet. Aus dem Verhältnis der Extinktionswerte $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm}$ wurde die Verunreinigung der RNA-Proben mit Protein abgeschätzt.

3.2.9 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die spezifische DNA-Amplifikation ermöglicht eine qualitative Beurteilung der Expression verschiedener Gene. Ausgehend von einer DNA-Matrize wurden mit Hilfe einer bakteriellen Polymerase komplementäre DNA-Stränge in ausreichender Menge hergestellt. Anschließend können sie durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

3.2.9.1 Generierung von cDNA

Um eine PCR durchführen zu können muss zunächst aus der isolierten RNA cDNA hergestellt werden. Dies geschieht mit Hilfe einer reversen Transkriptase und dem *SuperscriptTM First-Strand Synthesis* Kit von Invitrogen nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 500 ng RNA mit RNase freiem Wasser zu einem Volumen von $10,75 \text{ } \mu\text{l}$ aufgefüllt. Zu diesem Gemisch fügte man noch $1 \text{ } \mu\text{l}$ Oligo-dt-Primer und $1 \text{ } \mu\text{l}$ einer 10 mM dNTP-Lösung und erhitzte es für 5 min bei $65 \text{ } ^\circ\text{C}$ um eine optimale Primer-Anlagerung zu erreichen. Daraufhin fügte man $4 \text{ } \mu\text{l}$ $5 \times$ FS-Puffer mit MgCl_2 , $2 \text{ } \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ DTT, $1 \text{ } \mu\text{l}$ RNase Out und $0,25 \text{ } \mu\text{l}$ SuperScript II hinzu und inkubierte den Ansatz für die cDNA-Synthese 50 min bei $42 \text{ } ^\circ\text{C}$. Im Anschluss wurde die reverse Transkriptase 15 min bei $70 \text{ } ^\circ\text{C}$ inhibiert. Die cDNA konnte dann bei $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden.

3.2.9.2 PCR

Für die Durchführung der PCR wurde $1 \text{ } \mu\text{l}$ cDNA verwendet. Diese wurde in PCR-Strips vorgelegt. Daraufhin wurde ein Mastermix aus $1,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , $100 \text{ } \mu\text{M}$ dATP, dTTP, dCTP und dGTP, je 5 pM Vorwärts- und Rückwärts-Primer sowie $0,5$

U Taq-Polymerase, sowie 1 x Reaktionspuffer hergestellt und mit der cDNA vermischt. Um die Reaktion zu erhöhen wurde den Ansätzen außerdem 1/20 Volumen DMSO beigefügt.

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm:

Tabelle 3:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende	94 °C	5 min	1
Denaturierung			
Denaturierung	94 °C	30 s	35
Primer-Anlagerung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Abschließende	72 °C	10 min	1
Elongation			

Nach der PCR wurden die Produkte in einem 1%igem Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel aufgetrennt und mit einem Geldokumentationssystem abgebildet. Um zu testen, ob die cDNAs die gleichen Konzentrationen haben, wurde eine PCR mit dem Haushaltsgen β_2 -Mikroglobulin durchgeführt.

3.2.10 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse wurde von der Microarray-Facility des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt und ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten

PPAR γ ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, von dem schon bekannt ist, dass er bei Aktivierung zur Apoptose und Wachstumsstopp bei verschiedenen Tumoren führt. Er wird hauptsächlich in Fettgewebe exprimiert, aber zu einem geringeren Maße auch in anderen Geweben wie z.B. der Niere (Wang et al; 2006).

Um zu untersuchen, ob PPAR γ in Nierenzellkarzinomen exprimiert wird, wurde eine Microarray-Analyse von Tumor-Proben von 34 verschiedenen Patienten aus dem Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Expression von PPAR γ , im Vergleich zur Expression in einer Normalniere, in bis zu 80 % der untersuchten Proben stark erhöht war (Abbildung 3).

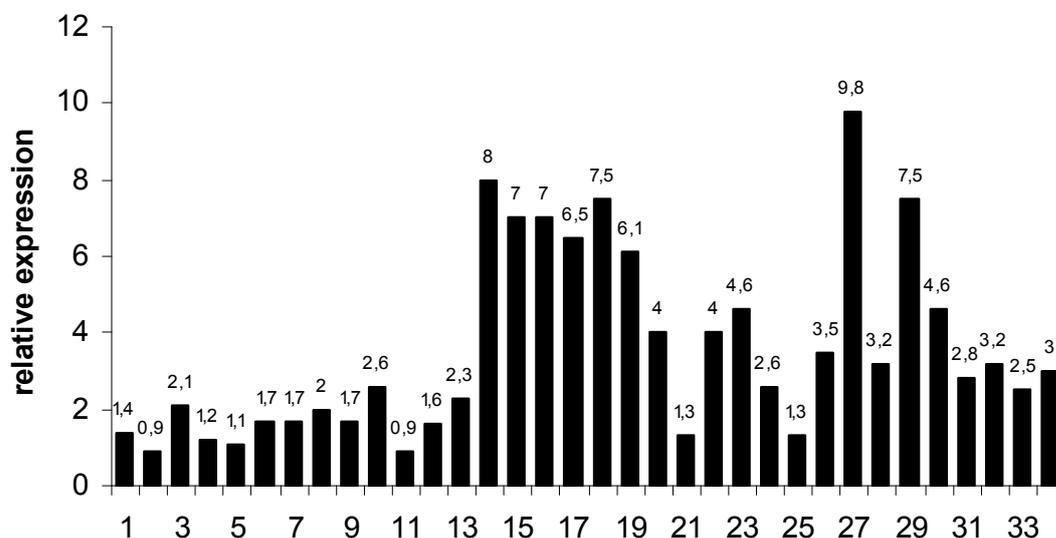


Abb. 3: Microarray-Analyse von 34 Patienten mit Nierenzellkarzinom auf die Expression von PPAR γ . Gezeigt ist die relative Expression im Vergleich zur Expression in der Normalniere (=1).

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene Nierenzellkarzinom-Zelllinien, A498, CAKI-2 und MZ1774, verwendet. Bevor sie in die Versuche eingeschlossen

werden konnten, musste analysiert werden, ob sie den Transkriptionsfaktor PPAR γ exprimieren. In Abbildung 4 ist zu sehen, dass alle drei Zelllinien PPAR γ in ähnlichem Umfang exprimieren und somit geeignet für die Untersuchung der Auswirkungen von PPAR γ sind.

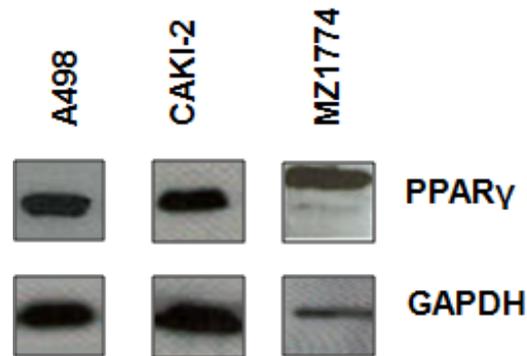


Abb. 4: Westernblot-Analyse der Expression von PPAR γ in Ganzzelllysaten der Nierenzellkarzinom Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774. Als Kontrolle für eine gleiche Gelbeladung, wurde GAPDH verwendet.

Um daraufhin die Effekte der PPAR γ -Aktivierung auf die Zellen zu untersuchen, wurden sie für 48 Stunden mit dem hoch affinen PPAR γ -Agonisten Troglitazone inkubiert. Es wurden Konzentrationen zwischen 1 und 40 μ M verwendet und die Auswirkungen auf die Zellen untersucht.

4.2 Die Aktivierung von PPAR γ inhibiert die Sekretion von IL-6

IL-6 ist ein Zytokin, das im Nierenzellkarzinom häufig überexprimiert wird und als autokriner Wachstumsfaktor wirkt. (Alberti et al; 2004; Wang et al; 2006).

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von PPAR γ einen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 hat, wurden die drei unterschiedlichen Zelllinien mit steigenden Konzentrationen (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M) des hochaffinen synthetischen PPAR γ -Liganden Troglitazone inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einer verminderten Sekretion von IL-6 in allen drei verwendeten Zelllinien führt (Abb. 5). Bei der Verwendung von 40 μ M Troglitazone war die Sekretion bei A498-Zellen um 66%, bei CAKI-2 um 54% und bei MZ1774-Zellen sogar um 75 % verringert.

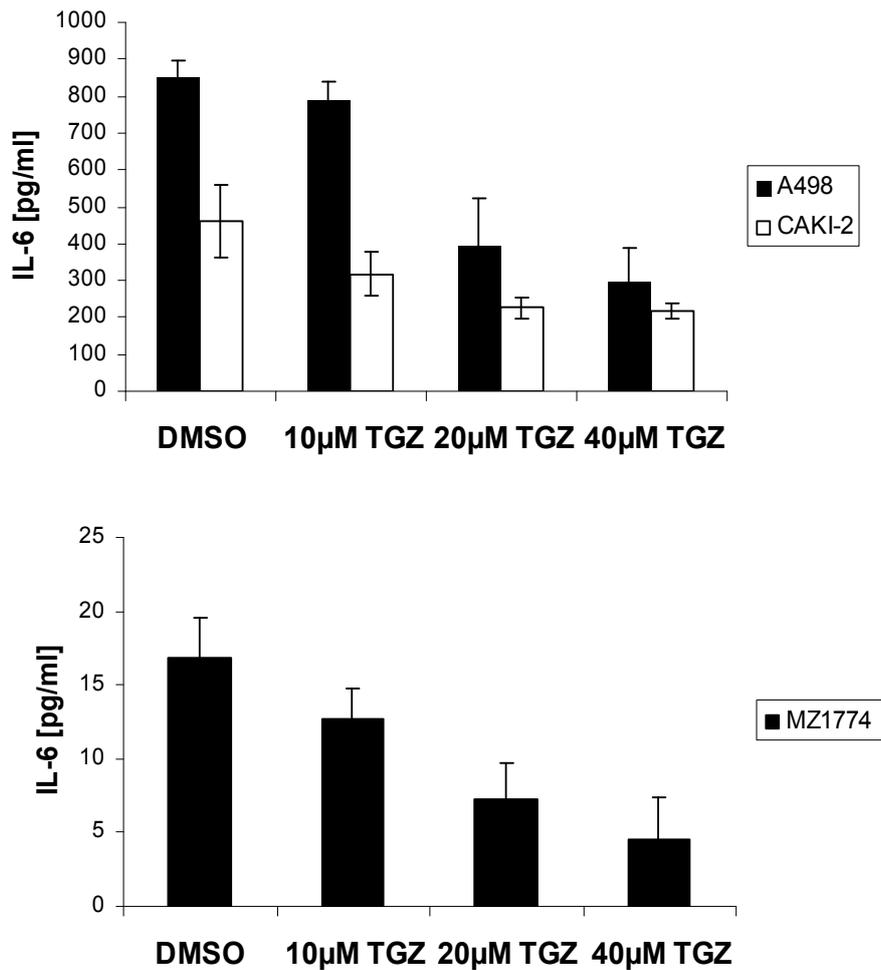


Abb. 5: Effekte von Troglitazone auf die Sekretion des Zytokins IL-6 der Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774. Die Zytokin-Sekretion wurde mittels eines ELISA-Assays analysiert.

4.3 Der Effekt von Troglitazone auf intrazelluläre Signalwege

Die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch Tumorzellen wird durch verschiedene Signalwege, wie den MAPK-, STAT- oder den PI3K-Weg vermittelt. Da in vielen Tumoren, wie auch im Nierenzellkarzinom, verschiedene intrazelluläre Signalwege, wie z.B. der MAP-Kinase-Weg, häufig konstitutiv aktiviert sind, kommt es zu einer dauerhaften Transkription der spezifischen Gene. Dieses wird zusätzlich durch die Überexpression von Wachstumsfaktoren oder Mutationen in den Raf- und Ras-Kinasen ausgelöst. Die Signaltransduktion über den Raf/ERK-Kinase-Weg aktiviert z.B. verschiedene Gene, die die Angiogenese

und das Überleben des Tumors sichern (Oka et al; 1995). Um zu untersuchen, ob die PPAR γ -Aktivierung einen Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden hat, wurden der MAPK-, der PI3K/Akt- und der JAK/STAT-Signalweg analysiert.

4.3.1 Einfluss von Troglitazone auf den MAPK-Signalweg

Als erstes wurde untersucht, ob die Inkubation der Zellen mit Troglitazone einen Effekt auf den MAPK-Signalweg hat. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, verringert die Aktivierung von PPAR γ die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 insbesondere in CAKI-2 und MZ1774 Zellen.

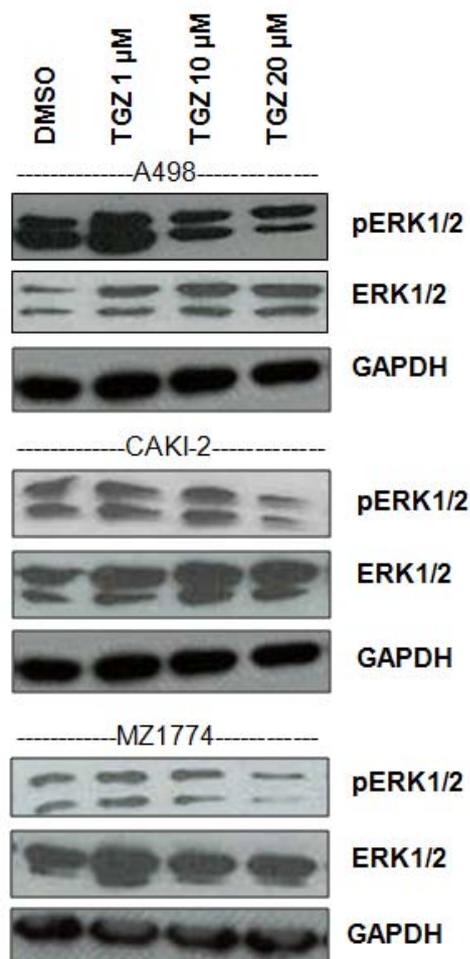


Abb. 6: Effekte von Troglitazone auf den MAPK-Signalweg. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im Western Blot analysiert.

Das lässt darauf schließen, dass die Aktivierung von PPAR γ einen Einfluß auf den Raf/ERK-Signalweg in NZK-Zelllinien hat, der unter anderem zu der Inhibition der Sekretion von Wachstumsfaktoren führt.

Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf eine Toxizität von Troglitazone zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit dem spezifischen PPAR γ -Inhibitor GW9662 vorbehandelt. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Zellen, die in Kombination mit GW9662 und Troglitazone inkubiert wurden, die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht abgenommen hat. Bei den Zellen, die nur mit Troglitazone behandelt wurden, liegt wiederum eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 vor (gezeigt für die Zelllinie CAKI-2, Abb. 7).

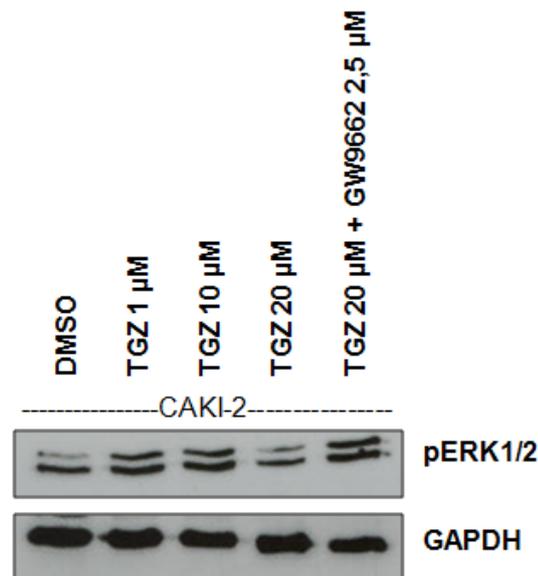


Abb. 7: Effekt des PPAR γ -Inhibitors GW9662 in Kombination mit Troglitazone auf CAKI-2 Zellen. Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 im Western Blot

4.3.3 Einfluss von Troglitazone auf den JAK/STAT-Signalweg

Auch der JAK/STAT Signalweg ist im Nierenzellkarzinom häufig konstitutiv aktiviert. Er führt zur Transkription von Genen, die das Überleben des Tumors sichern. Da IL-6 zur Aktivierung von JAK1 und STAT3 führt, wurden diese beiden Mitglieder des JAK/STAT-Signalweges auf Effekte durch die Inkubation der Zellen

mit Troglitazone untersucht (Horiguchi et al; 2002; Shang et al; 2007a). Es konnte allerdings nur eine leichte Abnahme der Phosphorylierung von STAT3 und JAK1 in CAKI-2 und MZ1774 Zellen gefunden werden (Abb. 8). In CAKI-2-Zellen wurde STAT3 fast überhaupt nicht im phosphoryliertem Zustand nachgewiesen.

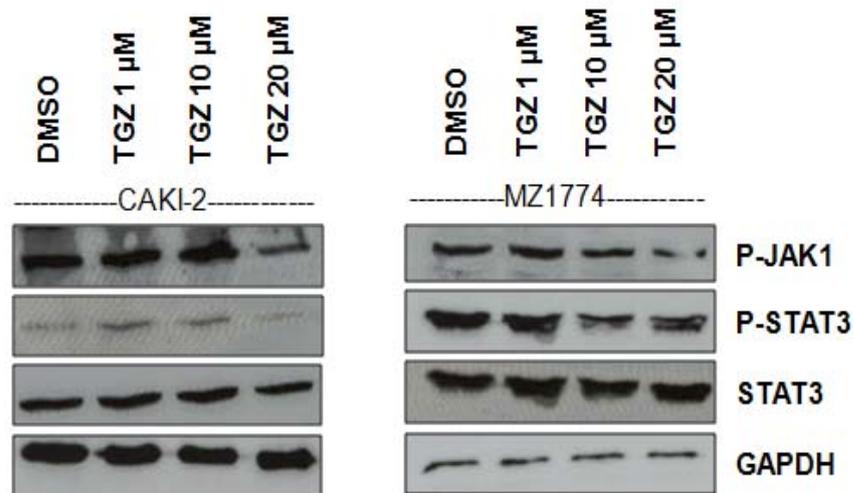


Abb. 8: Effekt von Troglitazone auf den JAK/STAT-Signalweg. Analyse der Phosphorylierung von JAK1 und STAT3 in CAKI-2- und MZ1774-Zelllysaten mittels Western Blot.

4.3.2 Einfluss von Troglitazone auf den PI3K/Akt-Signalweg

Um weiterhin zu untersuchen, ob Troglitazone intrazelluläre Signalwege beeinflusst, wurde die Expression und Phosphorylierung von Molekülen des PI3K/Akt-Signalweges untersucht.

Der PI3K/Akt-Signalweg ist in vielen Tumoren konstitutiv aktiviert. Insbesondere Akt phosphoryliert viele Proteine, die eine antiapoptotische Wirkung haben und zum Überleben der Zelle beitragen (Soubier et al; 2006).

PTEN ist ein Tumorsuppressorgen, das die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kontrolliert. Die Funktion von PTEN ist im Nierenzellkarzinom häufig durch Mutationen ausgeschaltet, was zu einem konstitutiv aktiviertem PI3K/Akt-

Signalweg führt. Im Promotor von PTEN befinden sich Funktionale PPREs und es wird angenommen, dass die Aktivierung von PPAR γ zur Induzierung der PTEN-Expression in Mäusen führt (Teresi et al; 2006). mTOR ist ein wichtiges Protein unterhalb von PTEN und aktiviert bei Phosphorylierung verschiedene Kinasen die zur Transkription von Genen führt, die wichtig für das Überleben der Zelle sind.

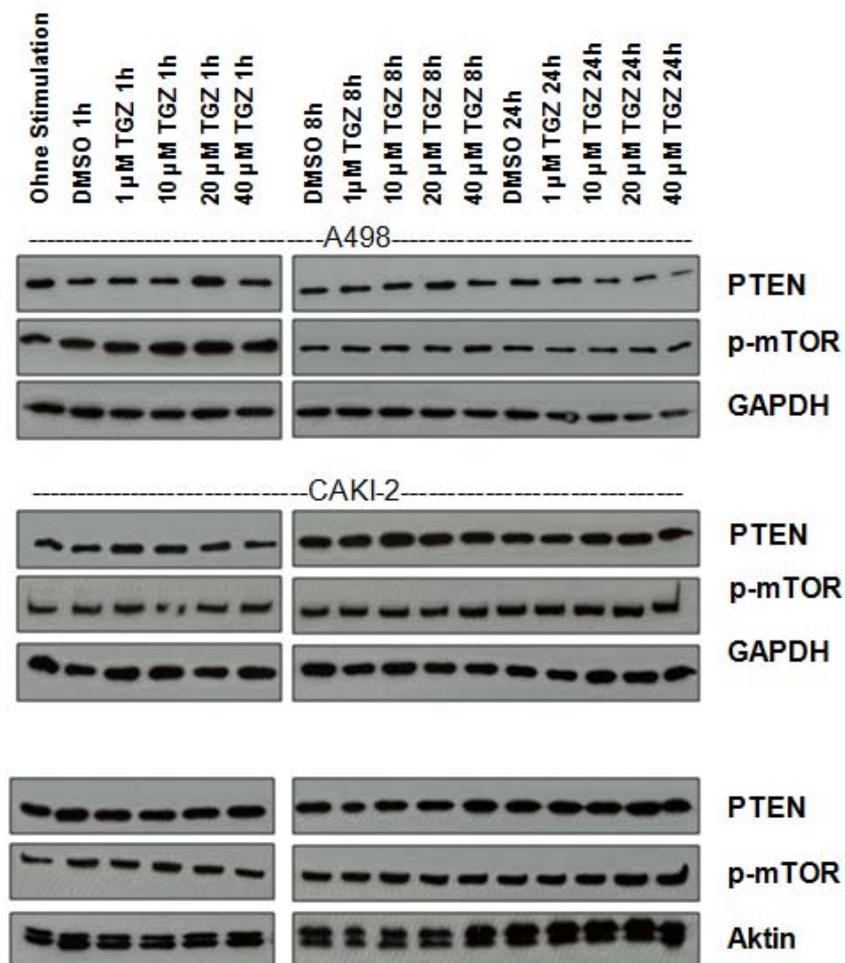


Abb. 9: Westernblot-Analyse von Zelllysaten aus einer Kinetik zwischen 1 und 24 Stunden. A498, CAKI-2 und MZ1774 Zellen wurden für 1, 8 oder 24 Stunden mit steigenden Troglitazone-Konzentrationen behandelt und der Effekt auf die Expression von PTEN und die Phosphorylierung von mTOR mittels Western Blot analysiert.

Um den Einfluss von Troglitazone auf den PI3K-Weg zu untersuchen, wurde eine Kinetik durchgeführt und die Zellen zwischen 1 und 24 Stunden mit Troglitazone

behandelt. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, wurden zu keinem Zeitpunkt Veränderungen bei der Expression von PTEN, noch bei der Phosphorylierung des *Downstream*-Moleküls mTOR festgestellt.

Dass Troglitazone nur einen Einfluss auf spezifische Signalwege hat, deutet daraufhin, dass die Effekte von Troglitazone PPAR γ -abhängig sind und nicht durch Toxizität ausgelöst werden.

4.4 Der NF- κ B Signalweg wird durch Troglitazone inhibiert

Es wird angenommen, dass der NF- κ B Signalweg in verschiedenen Nierenzellkarzinom-Zelllinien konstitutiv aktiviert ist und dass die Aktivität besonders im metastasierenden NZK erhöht ist. NF- κ B ist an Signalwegen unterhalb der MAP-Kinase- und PI3-Kinase-Signaltransduktion beteiligt und induziert die Transkription von Genen, die für die Sekretion von Wachstumsfaktoren, die Tumor-Proliferation, das Tumor-Überleben und für die Angiogenese wichtig sind (Oya et al; 2001; Oya et al; 2003).

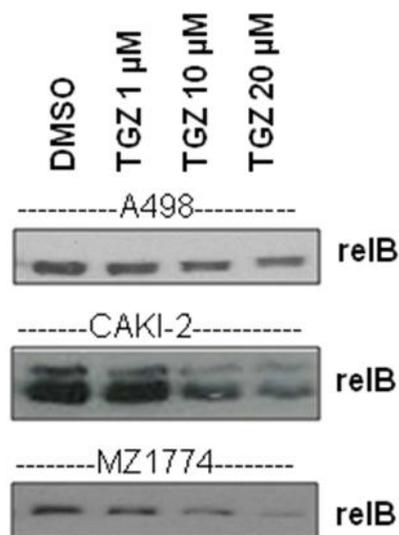


Abb. 10: Effekt der PPAR γ -Aktivierung auf den NF- κ B-Signalweg. Western Blot-Analyse von Kernextrakten der NZK-Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 auf die nukleäre Expression von relB.

Es wurde schon gezeigt, dass PPAR γ -Liganden in den NF κ B-Signalweg eingreifen, indem sie die nukleäre Expression von NF- κ B-Mitgliedern wie relB reduzieren (Appel et al; 2005; Chung et al; 2000; Ray and Prefontaine; 1994; Wan et al; 2008).

Die Inkubation der NZK-Zellen mit Troglitazone führte zu einer verminderten nukleären Expression des NF- κ B Mitglieds relB. Die stärkste Inhibition konnte in CAKI-2 Zellen festgestellt werden (Abb. 10).

4.5 PPAR γ -Aktivierung führt zu einer verminderten nukleären Expression von HIF1 α

HIF1 α ist, wie in der Einleitung erwähnt, ein Transkriptionsfaktor, der wegen der Hochregulation von Wachstumsfaktoren wie VEGF, TGF β , PDGF und IL-6 eine Schlüsselrolle in der Tumor-Proliferation und Angiogenese des NZK spielt. HIF1 α ist in vielen NZK auf Grund einer Mutation in der E3-Ubiquitin-Ligase VHL konstitutiv aktiviert. Um die nukleäre Translokation von HIF1 α im Nukleus der Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 zu analysieren, wurde eine Western Blot-Analyse von Kernextrakten durchgeführt. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von Troglitazone inkubiert und daraufhin die Expression von HIF1 α im Nukleus untersucht.

Wie schon von anderen Gruppen berichtet, wurde bei A498-Zellen keine Expression von HIF1 α -Protein gefunden. Auf dem Transkriptions-Level konnte allerdings HIF1 α -mRNA detektiert werden, die keine Regulation nach Behandlung mit Troglitazone zeigte (Abb. 11).

Bei CAKI-2 und MZ1774 Zellen wurde nach PPAR γ -Aktivierung eine verminderte Expression von HIF1 α in nukleären Extrakten beobachtet (Abb. 11). Dies repräsentiert einen neuen und wichtigen Mechanismus in der Aktivität von PPAR γ . Besonders in CAKI-2 Zellen wurde die Expression nach Inkubation mit 20 μ M Troglitazone stark inhibiert. Die Inhibition ist kein Resultat einer verminderten Transkriptionsrate, da auf mRNA-Ebene keine Regulation von HIF1 α gefunden wurde.

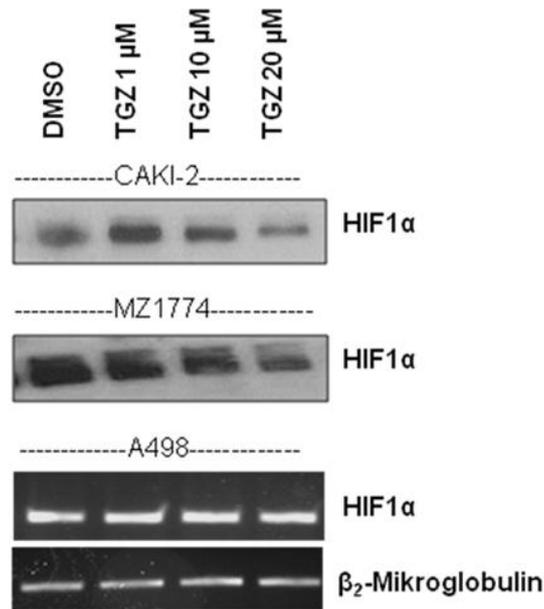


Abb. 11: Effekt von Troglitazone auf den HIF-Signalweg. Analyse der nukleären Expression von HIF1α durch eine Westernblot-Analyse von Kernextrakten bei CAKI-2- und MZ1774-Zellen. Analyse der Transkription von HIF1α durch eine PCR bei A498-Zellen.

4.6 Troglitazone induziert Apoptose in NZK-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die bisher gezeigten Effekte auf Grund einer Apoptoseinduktion eintraten, wurde die Apoptoserate der Zelllinien nach Behandlung mit Troglitazone untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass A498-Zellen höchst empfindlich gegenüber PPAR γ -Aktivierung waren. Sie wiesen eine Apoptoserate von 63% nach der Inkubation mit 20 μ M Troglitazone auf. Im Gegensatz dazu, zeigte die Inkubation mit Troglitazone bei CAKI-2- und MZ1774-Zellen kaum einen Effekt. Die Apoptoserate unterschied sich bei einer Konzentration von 20 μ M Troglitazone nur um 5 % von den Zellen, die mit DMSO behandelt wurden (Abb. 12).

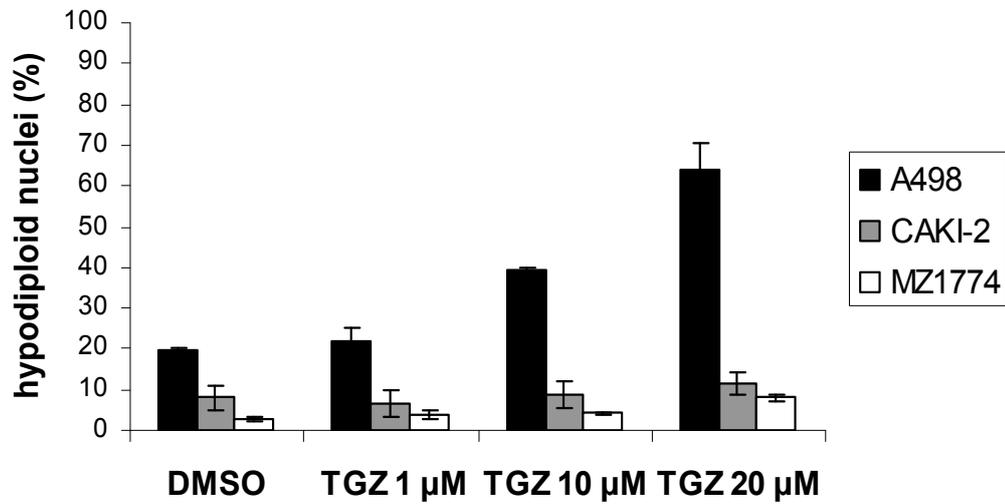


Abb. 12: Messung der Apoptoserate mittels Propidiumiodid-FACS-Analyse der Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 nach Inkubation mit Troglitazone.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Zelllinien mit Troglitazone inkubiert und die Caspase-3-Aktivität in den Zellen gemessen.

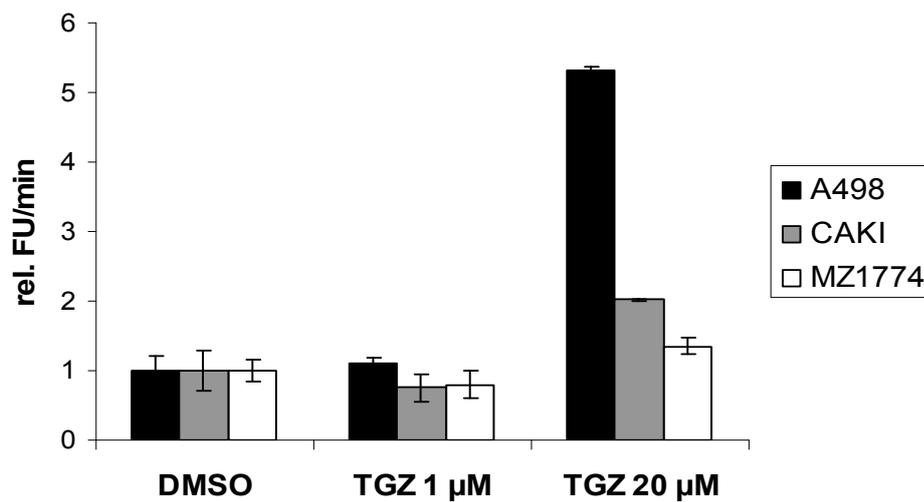


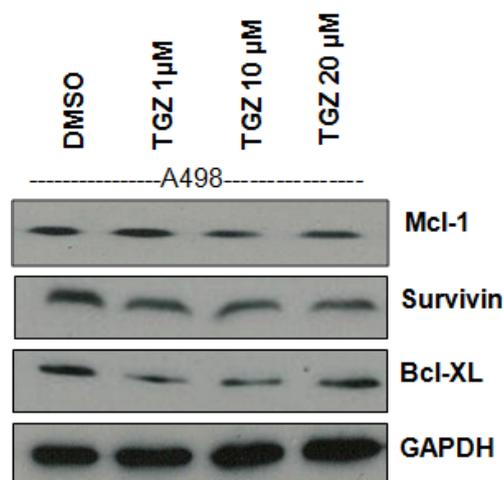
Abb 13: Analyse der Caspase-3-Aktivität in den Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 durch fluorometrische Messung nach Inkubation mit Troglitazone.

Die Caspase-3 wird bei Apoptoseinduktion in ihre aktiven Untereinheiten gespalten. Dies geschieht nach der Aktivierung des extrinsischen oder intrinsischen Signalweges durch spezifische proapoptotische Stimuli. Die aktive Caspase-3 ist eine eindeutige Charakteristik von Zellen, bei denen apoptotischer Zelltod ausgelöst wird.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Caspase-3 nur bei A498 Zellen nach der Inkubation mit Troglitazone signifikant ansteigt (Abb 13).

Zusätzlich zu der Messung der Apoptoserate und Caspase-3-Aktivität wurde die Expression der antiapoptotischen Moleküle Survivin, BCL-X_L und Mcl-1 untersucht. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, führt die Aktivierung von PPAR γ in allen untersuchten Zelllinien zu einer verminderten Expression von Survivin und Mcl-1. Die Expression von BCL-X_L nahm nur in A498 und CAKI-2 Zellen ab.

Interessanterweise wurden in den Zelllinien (CAKI-2, MZ1774) mit der höchsten Resistenz gegenüber einer Apoptose-Induktion die stärkste Herunterregulierung von Survivin und Mcl-1 gefunden.



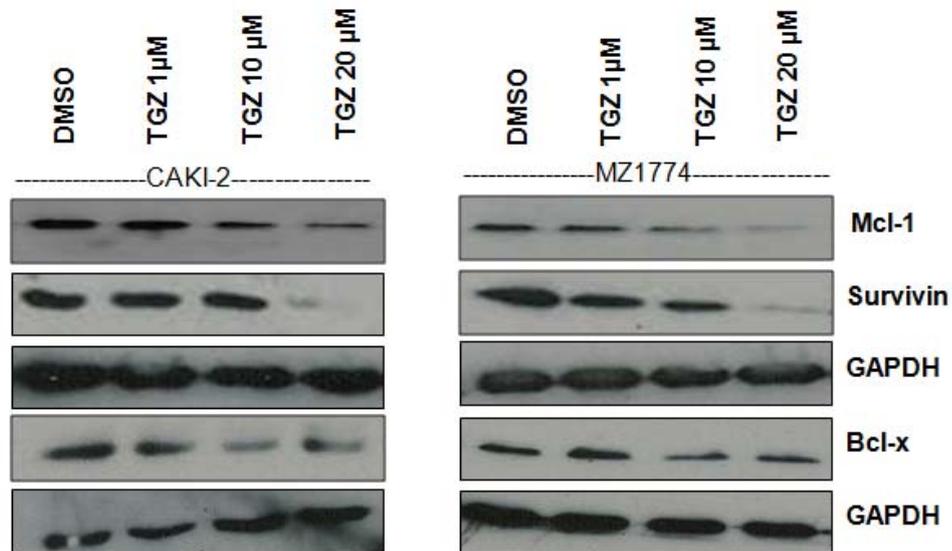


Abb. 14: Effekte von Troglitazone auf die Expression von antiapoptotischen Molekülen. Analyse der Expression von Mcl-1, Bcl-X_L und Survivin in den Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 mittels Western Blot.

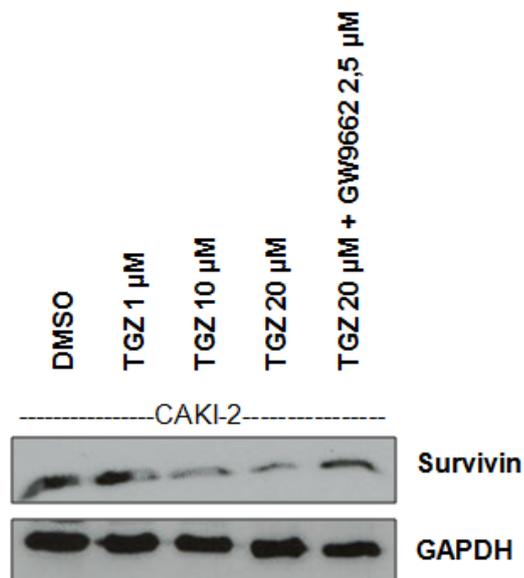


Abb. 15: Effekt der kombinierten Inkubation von Troglitazone und dem PPAR γ -Inhibitor GW9662 auf die Expression von Survivin. Zelllysate von CAKI-2 wurden im Western Blot analysiert.

Um zu bestimmen, ob diese Effekte PPAR γ -abhängig sind, wurde die Expression des antiapoptotischen Moleküls Survivin in CAKI-2 Zellen nach Vorinkubation mit dem PPAR γ -Inhibitor GW9662 untersucht. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, inhibiert die Behandlung mit GW9662 die Effekte von Troglitazone auf die Expression von Survivin.

Diese Effekte traten nicht auf Grund einer veränderten Expression von PPAR γ selbst auf, da durch die Inkubation mit Troglitazone weder im Zytosol noch im Nukleus eine veränderte Expression von PPAR γ nachgewiesen werden konnte (Abb. 16).

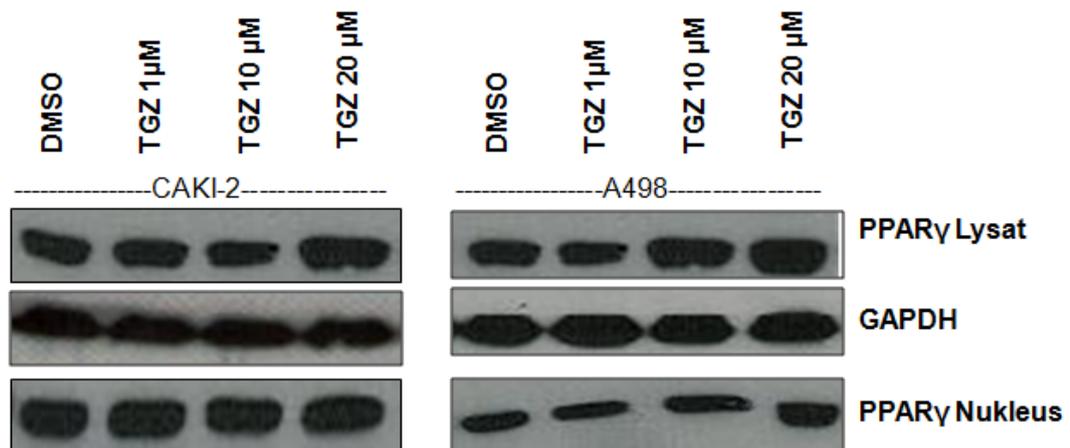


Abb. 16: Effekt von Troglitazone auf die Expression von PPAR γ im Zytosol und Nukleus. Kernextrakte und Zelllysate von A498 und CAKI-2 Zellen wurden im Western Blot analysiert.

Nach den bisherigen Ergebnissen gibt es keinen Zusammenhang zwischen Induktion von Apoptose, Expression von antiapoptotischen Molekülen und der Inhibition der MAPK- und NF- κ B-Signalwege.

4.7 Synergistische Effekte von Troglitazone und Bortezomib

Der Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg spielt eine große Rolle in vielen zellulären Vorgängen, wie z.B. bei dem Erhalt der Homöostase oder dem Abbau verschiedener regulatorischer Proteine. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Regulation über Ubiquitinierung essentiell für die Funktion vieler Proteine ist, die an der Tumorgenese beteiligt sind, wie z.B. Zykline, p53 oder NF- κ B (Adams et al; 2000; Wu; 2002).

Auch PPAR γ wird nach seiner Aktivierung durch das Proteasom abgebaut. Es wurde deshalb angenommen, dass die Proteasom-Inhibition die PPAR γ -Aktivität durch den verminderten proteasomalen Abbau von PPAR γ selbst und durch die Hochregulierung von RXR-alpha verstärken könnte. Außerdem wurde bei beiden Substanzen gezeigt, dass sie in die MAPK- und NF- κ B-Signalwege eingreifen (Appel et al; 2005; Chung et al; 2000; Nawrocki et al; 2005; Weber et al; 2004).

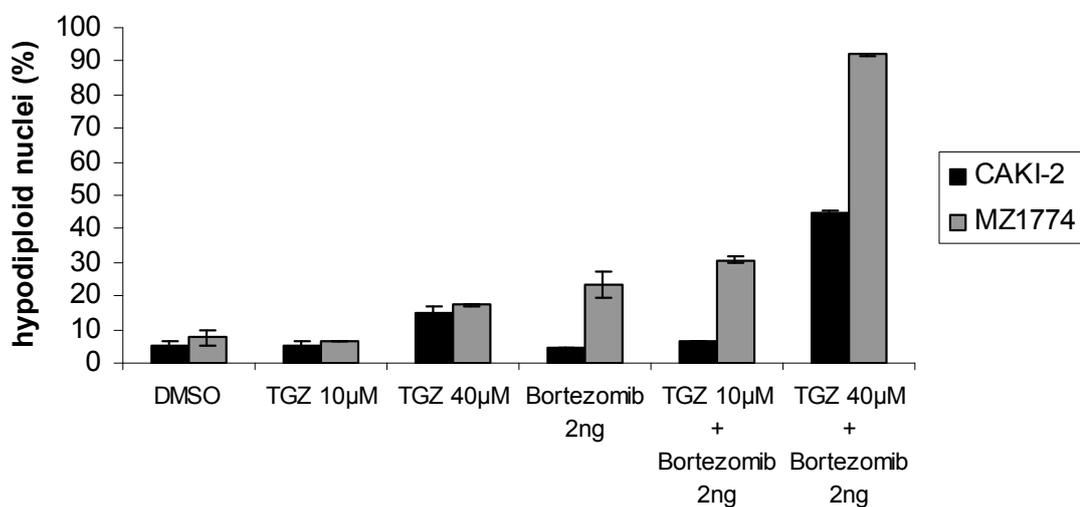


Abb. 17: Die Zelllinien CAKI-2 und MZ1774 wurden einzeln und in Kombination mit Troglitazone und Bortezomib behandelt und die Apoptoserate mittels FACS-Analyse nach Propidiumiodid-Färbung ermittelt.

Um einen möglichen Effekt der Proteasom-Inhibition auf die Wirkung des PPAR γ -Agonisten zu untersuchen, wurden die Zelllinien CAKI-2 und MZ1774, die die größte Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion zeigten, mit dem Proteasom-

Inhibitor Bortezomib vorbehandelt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 2 ng/ml Bortezomib in das Kulturmedium für 24h mit dem Proteasom-Inhibitor vorinkubiert und danach mit unterschiedlichen Konzentrationen von Troglitazone inkubiert. Die Einhaltung der Reihenfolge war wichtig, da bei Erstbehandlung mit Troglitazone keine synergistischen Effekte nachgewiesen werden konnten.

Es wurde analysiert, ob die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und Troglitazone die Apoptose-Resistenz der CAKI-2- und MZ1774-Zelllinien überwinden kann. Wie in Abbildung 17 gezeigt ist, erhöht die Vorinkubation der Zellen mit Bortezomib die Apoptoserate von CAKI-2- und MZ1774-Zellen beträchtlich. Sie steigt im Vergleich zur Behandlung mit 40 µM Troglitazone bzw. 2 ng/ml Bortezomib bei CAKI-2-Zellen um 30% bzw. 45% und bei MZ1774-Zellen sogar um 70% bzw. 50%.

Als nächstes wurde ein synergistischer Effekt bei der Expression des anti-apoptotischen Moleküls Survivin und bei der Spaltung von PARP-1 untersucht.

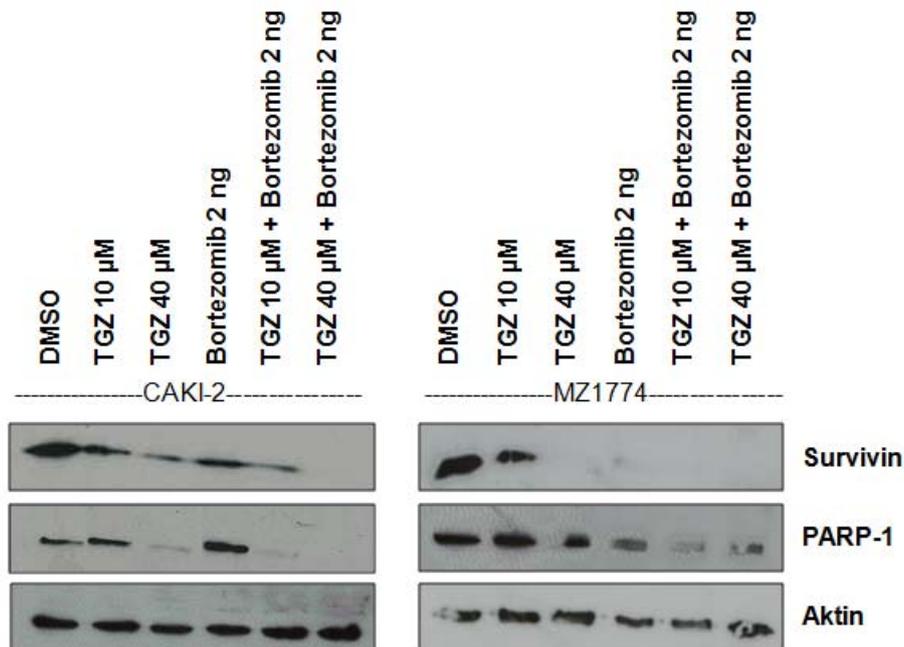


Abb. 18: Effekt von Troglitazone und Bortezomib auf die Expression von Survivin und die Spaltung von PARP-1. CAKI-2 und MZ1774 Zellen wurden mit Troglitazone und Bortezomib einzeln und in Kombination behandelt und die Zelllysate im Western Blot analysiert.

PARP-1 wird bei Apoptoseinduktion von der aktivierten Caspase-3 proteolytisch in 110 kb und 80 kb große Untereinheiten gespalten und ist ein Zeichen für die Einleitung des apoptotischen Zelltodes.

In Abbildung 18 ist gezeigt, dass die Kombination von Bortezomib und Troglitazone einen synergistischen Effekt bei der Herunterregulierung der Survivin-Expression und der PARP-1-Spaltung aufweist, insbesondere bei CAKI-2 Zellen.

Außerdem wurde noch untersucht, ob die Vorinkubation mit Troglitazone zu einer stärkeren Reduktion der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 führt. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Kombination aus Proteasom-Inhibition und PPAR γ -Aktivierung zu einer stärkeren Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 führt, als Troglitazone allein (Abb. 19).

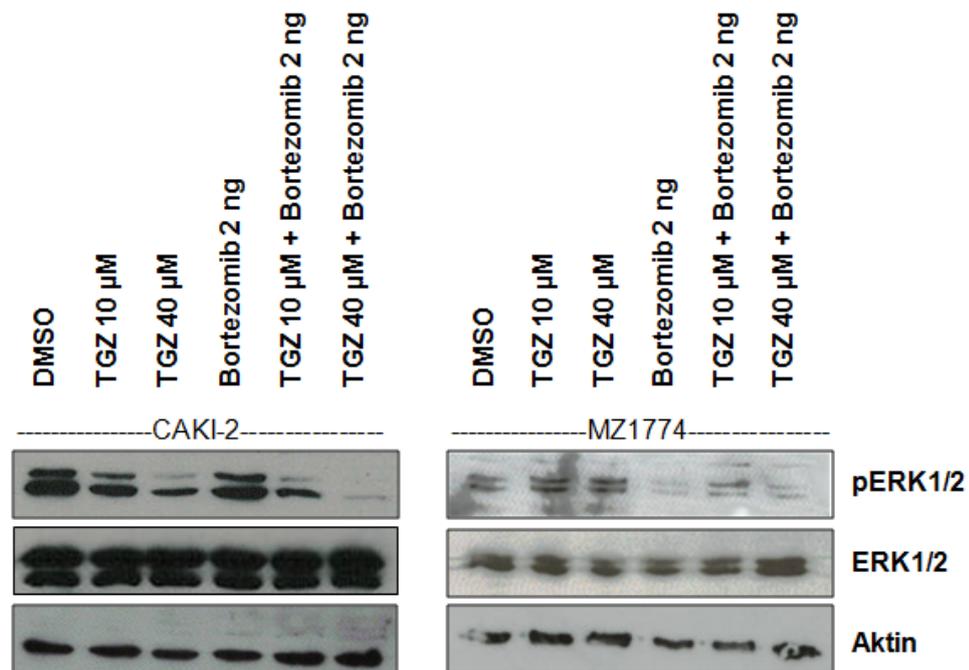


Abb. 19: Effekt der kombinierten Inkubation mit Troglitazone und Bortezomib auf den MAPK-Signalweg. Die Phosphorylierung von ERK in CAKI-2 und MZ1774 Zellen wurde im Western Blot analysiert.

Wie schon in Abschnitt 4.5 erläutert ist die übermäßige nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktor HIF1 α ein Charakteristikum des metastasierenden NZK. Es wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einer Abnahme der

nukleären Expression von HIF1 α führt. Deshalb wurde untersucht, ob die Kombination aus Bortezomib und Troglitazone einen noch stärkeren Effekt auf die verminderte nukleäre Expression von HIF1 α hat. In Abbildung 20 ist anhand der Zelllinie MZ1774 gezeigt, dass die Vorbehandlung der Zellen mit Bortezomib einen synergistischen Effekt auf die reduzierte nukleäre Translokation von HIF1 α hat.

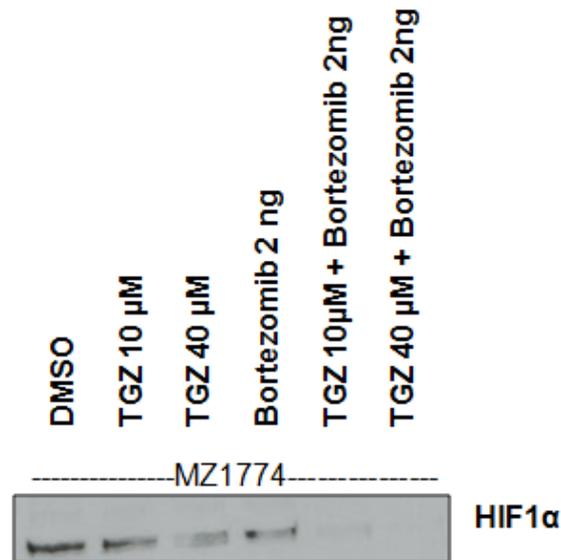


Abb. 20: Effekt der Kombination von Troglitazone und Bortezomib auf den Transkriptionsfaktor HIF1 α . Analyse von MZ1774-Kernextrakten im Western Blot.

Als letztes wurde untersucht, ob die Verstärkung der Wirkung von Troglitazone durch Proteasom-Inhibition auch bei der Zytokinsekretion von IL-6 eintritt. Es konnte eine 3 – 4fache Reduktion der IL-6 Sekretion in CAKI-2 Zellen im Vergleich zu einer Inkubation mit 40 μ M Troglitazone allein gefunden werden (Abb. 21).

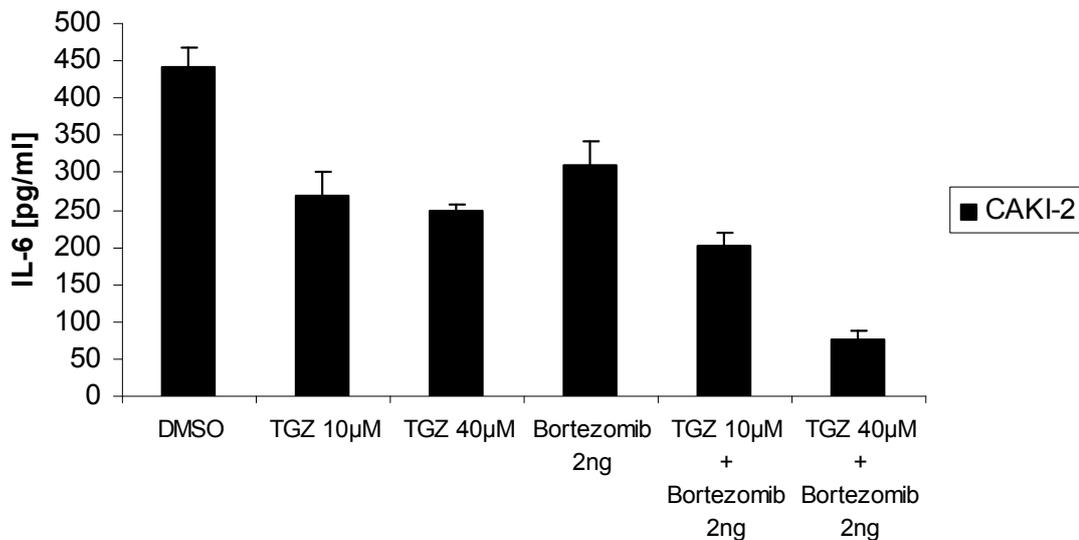


Abb. 21: Effekt der Kombination von Troglitazone und Bortezomib auf die Sekretion des Zytokins IL-6, gemessen mittels eines ELISA-Assays.

4.8 PPAR γ -Aktivierung induziert endoplasmatischen Stress

Eine Störung der Ca²⁺-Homöostase, die Inhibition der Protein-Glycosylierung oder die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen kann die Funktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER) stören und so zu der Auslösung von endoplasmatischem Stress führen.

Es ist schon von verschiedenen PPAR γ -Liganden bekannt, dass sie ER-Stress auslösen. Die PPAR γ -Aktivierung führt unter anderem zu der Induzierung der *Unfolded-Protein-Response* (UPR) in β -Zellen (Weber et al; 2004). Bortezomib kann auch ER-Stress auslösen, wenn auch auf einen anderem Weg. Bei der Proteasom-Inhibition kommt es zu einer Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen (Nawrocki et al; 2005; Werner et al; 1996). Die UPR führt zu unterschiedlichen zytoprotektiven Mechanismen, oder, falls diese nicht mehr greifen, zur ER-induzierten Apoptose.

Es wurde untersucht, ob die Kombination von Bortezomib und Troglitazone stärkeren ER-Stress auslösen als beide Substanzen alleine. Hierfür wurde die Expression des Stress-induzierten ER-Chaperons BiP und die Aktivität der Caspase-4, die im ER lokalisiert ist und zu ER-induzierter Apoptose führt,

untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurde Tunicamycin verwendet, welches die Glycosylierung von Proteinen verhindert und somit eine UPR einleitet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von BiP sowohl nach Inkubation von Troglitazone als auch von Bortezomib induziert wurde. Nach der kombinierten Behandlung stieg die Induktion allerdings noch um ein Vielfaches. Auch bei der Caspase-4 konnte gezeigt werden, dass die Spaltung in ihre aktive Form bei der Kombination von beiden Substanzen höher war, als bei alleiniger Behandlung (Abb. 22).

Diese Ergebnisse bekräftigen, dass die Aktivierung von PPAR γ und die gleichzeitige Inhibition des proteasomalen Abbaus die Effekte von PPAR γ -Agonisten bei der Inhibition des Tumorwachstum und der Induzierung von ER-vermittelter Apoptose verstärken können.

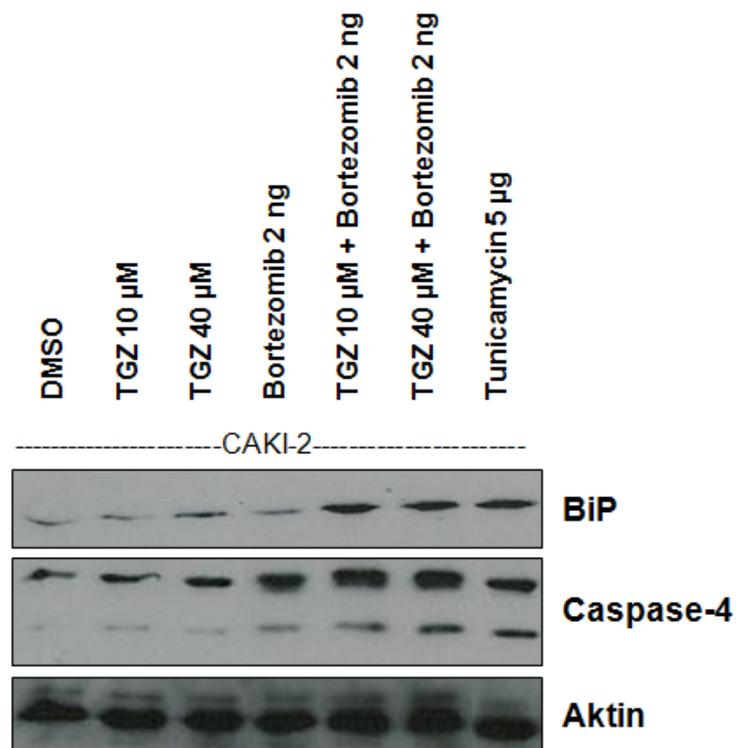


Abb. 22: Effekt der Kombination von Troglitazone und Bortezomib auf die Induktion von endoplasmatischem Stress. Analyse der Induktion des Chaperons BiP und der Aktivierung der Caspase-4 in CAKI-2-Zellen im Western Blot. Als Positiv-Kontrolle wurden 5 μ g Tunicamycin verwendet.

5. Diskussion

Das Nierenzellkarzinom ist der dritthäufigste Tumor der menschlichen Niere und in Deutschland treten jedes Jahr ca. 12 000 neue Fälle auf. Es ist sehr schwer zu therapieren, da keine typischen Symptome auftreten und es häufig erst diagnostiziert wird, wenn sich schon Metastasen gebildet haben. Außerdem ist es resistent gegenüber Chemo- und Strahlentherapie (Motzer et al; 2002). Die bisher angewandten Therapien, wie die Gabe von Zytokinen oder Tyrosinkinase-Inhibitoren, haben einigen Erfolge gezeigt, dennoch ist die Prognose bei ungünstigen Risikofaktoren schlecht und es werden dringend neue Therapie-Ansätze benötigt (Cohen and McGovern; 2005; McLaughlin and Lipworth; 2000). In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der PPAR γ -Aktivierung auf die Nierenzellkarzinom-Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der PPAR γ -Ligand Troglitazone die untersuchten Zellen auf verschiedenen zellulären Ebenen beeinflusst. Er greift unter anderem in verschiedene intrazelluläre Signalwege ein, wie den MAPK-, den NF- κ B- oder den HIF1 α -Signalweg. Das führt unter anderem zu einer verminderten Sekretion von Wachstumsfaktoren wie IL-6. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Troglitazone durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib gesteigert werden kann. Diese Ergebnisse machen den PPAR γ -Agonisten zu einem interessanten Agens für die Therapie des metastasierenden Nierenzellkarzinom, wenn er in Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib angewandt wird.

Die konstitutive Aktivierung von verschiedenen intrazellulären Signalwegen ist ein häufig vorkommendes Ereignis im Nierenzellkarzinom. Dadurch kommt es zur konstanten Transkription von Genen, die wichtig für die Proliferation, das Überleben und die Angiogenese des Tumors sind. Signalkaskaden, von denen man weiß, dass sie eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Metastasierung des NZK spielen sind der MAP-Kinase-, der NF- κ B- und der HIF-Signalweg (Nawrocki et al; 2005; Oka et al; 1995; Oya et al; 2001).

NF- κ B liegt normalerweise inaktiviert im Zytoplasma vor, wo er an sein inhibitorisches Protein I- κ B gebunden ist. Er wird aktiviert, wenn Wachstumsfaktoren wie IL-6 oder TGF β an ihre spezifischen Rezeptoren binden

und eine Signalkaskade auslösen. Das führt unter anderem zur proteasomalen Degradierung des NF- κ B-Inhibitor Proteins I- κ B und zur nukleären Translokation des NF- κ B-Komplexes. Dort leitet er die Transkription seiner Zielgene ein (Hayden and Ghosh; 2004). Im Nierenzellkarzinom, wie auch in vielen anderen Tumoren, ist die Inaktivierung von NF- κ B auf Grund von Mutationen unterhalb des Signalweges aufgehoben und somit kommt es zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate von NF- κ B-spezifischen Genen (Lee et al; 2007). Andere Gruppen haben gezeigt, dass die Aktivierung von PPAR γ durch seine Liganden die Expression der NF- κ B-Mitglieder relA und relB inhibiert und dass die Aktivierung von PPAR γ die Expression von NF- κ B in Epithelzellen herunterreguliert (Chinetti et al; 1998; Wang et al; 2002). Außerdem ist bekannt, dass PPAR γ physikalisch mit den NF- κ B-Mitgliedern p50 und p75 interagiert (Chung et al; 2000; Ray and Prefontaine; 1994; Wan et al; 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Troglitazone die nukleäre Expression des NF- κ B-Mitgliedes relB, einer Schlüssel-Komponente des antiapoptotischen Signalweges, vermindert.

Als nächstes wurde der Effekt von Troglitazone auf den MAP-Kinase-Signalweg analysiert. Diese Kaskade setzt sich aus einer Protein-Kinase-Kaskade zusammen, die als Antwort auf viele verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone aktiviert wird, die die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung beeinflussen.

Im Nierenzellkarzinom ist der MAP-Kinase-Signalweg konstitutiv aktiviert, was auf Mutationen in Kinasen unterhalb von ERK1/2 zurückzuführen ist. Beispiele dafür sind die MEK- oder die Raf- und Ras-Kinasen (Oka et al; 1995). Es wurde schon von mehreren Gruppen beobachtet, dass die Aktivierung von PPAR γ einen Einfluss auf den MAPK-Signalweg hat. Hier konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der NZK-Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 mit Troglitazone zu einer beträchtlichen Reduzierung der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 führt. Die verminderte Phosphorylierung von ERK ist unterschiedlich je nach verwendeter Zelllinie und Konzentration. Andere Studien haben gezeigt, dass PPAR γ einen unterschiedlichen Effekt auf den MAPK-Signalweg hat, je nachdem welche Zellen und was für ein Ligand verwendet wurde. PPAR γ -Liganden aktivieren ERK in Leber-Epithelzellen von Ratten und Neuroblastom-Zellen und regulieren die ERK-Phosphorylierung in pankreatischen Tumorzellen herunter

(Gardner et al; 2003; Jung et al; 2007; Kim et al; 2003; Motomura et al; 2005). Die wichtige Rolle der MAPK-Signalkaskade in der Apoptoseinduktion und dem Überleben von Zellen und die unterschiedliche Empfindlichkeit von NZK-Zellen gegenüber Troglitazone könnte die unterschiedliche Herunterregulierung von phospho-ERK1/2 erklären.

Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch Toxizität ausgelöst wird, wurden die Zellen mit dem PPAR γ -Inhibitor GW9662 vorbehandelt. Hierbei konnte keine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass dieser Effekt PPAR γ -abhängig ist.

Auch der PI3K-Signalweg ist in vielen Tumoren, inklusive dem NZK, konstitutiv aktiviert. Ein Grund dafür ist die Mutation von PTEN und der dadurch ausgelöste Verlust seiner Phosphatase-Aktivität (Myers et al; 1998). In normalen Zellen reguliert PTEN die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges, indem es das Adaptorprotein SHC dephosphoryliert. Neuere Studien haben zwei mögliche Bindungsstellen für PPAR γ im Promotor von PTEN entdeckt und haben gezeigt, dass PPAR γ -Liganden die Expression von PTEN in murinen und humanen inflammatorischen Zellen und in Tumorzellen steigern können (Castell et al; 1990; Patel et al; 2001). mTOR ist ein Mitglied des PI3K/Akt-Signalweges, das unterhalb von PTEN liegt und wird direkt durch Akt aktiviert. Die Inhibition von mTOR hat schon kleinere Erfolge bei der Behandlung des NZK gezeigt und außerdem wurde beobachtet, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazone die Phosphorylierung von mTOR im NSCLC inhibiert (Cho et al; 2007; Han et al; 2007).

Um einen möglichen Effekt von Troglitazone auf den PI3K-Signalweg zu analysieren, wurde eine Kinetik über 24 Stunden durchgeführt und die Expression von PTEN und die Phosphorylierung von mTOR untersucht. Es konnte allerdings zu keinem Zeitpunkt eine Regulation von PTEN oder eine verminderte Phosphorylierung von mTOR nachgewiesen werden. Nur in A498 Zellen war die Expression von PTEN nach einer Stunde leicht erhöht.

Eine konstitutive oder fehlerhafte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges tritt häufig in primären Tumoren auf und ist wichtig für die Proliferation und das Überleben des Tumors. JAK-1 ist ein Rezeptor für den autokrinen Wachstumsfaktor IL-6 und außerdem wird die Aktivierung von STAT3 durch IL-6 verbessert (Schuringa et al; 2000; Shang et al; 2007b; Wu; 2002). Da IL-6 im NZK überexprimiert ist, wurden diese beiden Mitglieder des JAK/STAT-Signalweges auf

Effekte durch PPAR γ -Aktivierung untersucht. Es konnte auch hier allerdings nur eine geringe Herunterregulierung der Phosphorylierung von JAK1 und STAT3 nach der Inkubation mit Troglitazone beobachtet werden. Bei CAKI-2-Zellen konnte nicht einmal eine effektive Phosphorylierung festgestellt werden.

Der MAPK- und der NF- κ B-Signalweg sind an der Regulation von vielen intrazellulären Kaskaden beteiligt, wie auch an der Hochregulierung der HIF1 α -Expression. Die vermehrte Translokation von HIF1 α in den Nukleus ist der Hauptauslöser für die unkontrollierte Angiogenese und die Proliferation des Nierenzellkarzinoms. In normalen Zellen wird HIF1 α nur bei Hypoxie hochreguliert. Auf Grund einer Mutation im Tumor-Suppressor-Gen VHL, die in mehr als 70% aller klarzelligen NZK auftritt, akkumuliert HIF1 α allerdings in den Tumorzellen. Das führt zu einer erhöhten Sekretion von Wachstums- und angiogenetischen Faktoren wie IL-6, VEGF oder PDGF. Das wiederum resultiert in Tumorwachstum, der Formierung von vaskulisierenden Gefäßen und der hämatogenetischen Ausbreitung des Tumors (Harris; 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einer sehr stark verminderten nukleären Expression von HIF1 α in CAKI-2- und MZ1774-Zellen führt. Die Akkumulation von HIF1 α scheint nicht nur von einer Mutation in dem VHL-Gen abhängig zu sein, da CAKI-2-Zellen ein Wildtyp VHL-Gen besitzen (Shinojima et al; 2007). Die Blockierung von HIF1 α durch den PPAR γ -Agonisten ist eine neue und wichtige Beobachtung und demonstriert einen neuen Mechanismus, durch den Troglitazone das Tumorwachstum und die Etablierung von Metastasen verhindern kann.

Einer der Wachstumsfaktoren, der von NZK-Zellen sekretiert wird und der die Expansion und Proliferation von malignen Zellen fördert, ist IL-6. IL-6 ist ein multipotentes Zytokin, das an zahlreiche biologische Aktivitäten, wie der Regulation der Proliferation und Differenzierung und der Induzierung der Expression von Akuten-Phase-Proteinen beteiligt ist (Alberti et al; 2004; Castell et al; 1990). Aber es ist auch an der Pathophysiologie von verschiedenen Neoplasien, wie dem Non-Hodgkin-Lymphom, dem Multiplen Myelom oder dem Nierenzellkarzinom beteiligt (Blay et al; 1992; Kawano et al; 1988).

Deshalb wurde hier die Expression von IL-6 nach der Behandlung der Zellen mit Troglitazone untersucht. Nach der Aktivierung von PPAR γ wurde eine verminderte

Sekretion von IL-6 in allen verwendeten Zelllinien gefunden. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf die vorher beobachtete Inhibition der Signalwege MAPK, NF- κ B und der reduzierten nukleären Expression von HIF1 α zurückzuführen.

Als nächstes sollte die Rolle der Apoptose bei den durch Troglitazone ausgelösten Effekten untersucht werden. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von PPAR γ eine Apoptoseinduktion bei verschiedenen Tumoren, wie Darmkrebs (Ming et al; 2006), Lungenkrebs oder Brustkrebs auslöst (Koeffler; 2003). Es gibt unterschiedliche Berichte, auf welchem Weg Troglitazone zur Apoptoseinduktion führt. Chinetti et al. hat beobachtet, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einer Inhibition der transkriptionalen Aktivität der NF- κ B-Untereinheit relA/p65 führt (Chinetti et al; 1998). Shimada et al. hat herausgefunden, dass die Aktivität von PPAR γ eine Herunterregulierung von antiapoptotischen Genen auslöst (Shimada et al; 2002). In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Troglitazone Apoptose in einer Dosis-abhängigen Art und Weise induziert. Bei A498-Zellen reichte schon eine Konzentration von 10 μ M Troglitazone zur Apoptoseinduktion, wohingegen bei CAKI-2- und MZ1774-Zellen selbst die Inkubation mit hohen Konzentrationen keine Effekte zeigte. Die Zellen zeigten allerdings eine ähnliche Herunterregulierung von IL-6, phospho-ERK1/2, HIF1 α und relB.

Außerdem wurde beobachtet, dass die antiapoptotischen Moleküle wie Mcl-1, Bcl-X_L oder Survivin nach der Inkubation mit Troglitazone nicht nur in den Apoptoseempfindlichen Zellen A498, sondern auch in CAKI-2- und MZ1774-Zellen herunterreguliert wurden.

Mcl-1 und Bcl-X_L sind antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie und es wird angenommen, dass die Eliminierung von Survivin für die Apoptoseinduktion durch genotoxische Substanzen notwendig ist (Nijhawan et al; 2003). Für Bcl-X_L wurde schon gezeigt, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazone seine Expression in anaplastischen thyroiden Tumoren herunterreguliert (Aiello et al; 2006). Survivin gehört zu der Familie der Inhibitoren-der-Apoptose-Proteinen (IAP) und eine hohe Expression dieses Proteins charakterisiert eine aggressive Form des metastasierenden Nierenzellkarzinoms (Parker et al; 2006).

Da Troglitazone nur spezifische Signalwege wie den MAPK, NF- κ B und HIF-Weg inhibiert, auf andere in Tumoren konstitutiv aktivierten Kaskaden aber keinen Einfluss hat, lässt darauf schließen, dass die Effekte PPAR γ -abhängig sind und nicht durch Toxizität ausgelöst werden. Da die Aktivierung von PPAR γ außerdem

nur bei A498-Zellen Apoptose auslöst, es aber bei allen Zelllinien zu einer Herunterregulierung von antiapoptotischen Molekülen wie IL-6, phospho-ERK, relB und HIF1 α kommt, scheint es keinen Zusammenhang zwischen der Induktion von apoptotischem Zelltod und den anderen zellulären Effekten von Troglitazone zu geben.

Um zu versuchen die Resistenz von Troglitazone-induzierter Apoptoseinduktion in CAKI-2 und MZ1774-Zellen zu überwinden, wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib vorbehandelt. Bortezomib ist ein synthetischer spezifischer Inhibitor der chymotrypsin-ähnlichen Untereinheit des 20S Proteasoms und es wurde schon gezeigt, dass er zu Apoptose und Wachstumsstopp in einer Vielzahl von Tumoren führt (Adams et al; 2000; Cortes et al; 2004; Kondagunta et al; 2004). Die Degradierung durch das Proteasom ist für viele Proteine, die an der Tumorgenese beteiligt sind, unerlässlich. Zykline, p53 oder auch NF- κ B können ihre Funktion nur korrekt ausführen, wenn sie selbst oder ihre regulatorischen Proteine durch das Proteasom degradiert werden (Wu; 2002).

Interessanterweise wird auch PPAR γ nach seiner Aktivierung durch das Proteasom abgebaut. Es wurde schon gezeigt, dass die Koinkubation von PPAR γ -Agonisten und Proteasom-Inhibitoren die Transaktivität von PPREs und die Expression von RXR-alpha erhöhen und somit die Aktivität von PPAR γ steigern könnten (Tsao et al; 2005).

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von NZK-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib zu einer gesteigerten Apoptoserate nach PPAR γ -Aktivierung führt. Selbst in den Zelllinien CAKI-2 und MZ1774, die resistent gegenüber der Apoptoseinduktion durch Troglitazone waren, wurde bei der kombinierten Inkubation apoptotischer Zelltod beobachtet. Dieser Effekt wurde nur beobachtet, wenn die Zellen mit Bortezomib vorbehandelt wurden. Das deutet darauf hin, dass ein synergistischer Effekt nur erreicht werden kann, wenn das Proteasom vor der Inkubation mit Troglitazone inhbiert ist.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Koinkubation mit Bortezomib und Troglitazone zu einer stärkeren Inhibition der MAPK und der nukleären Expression von HIF1 α führt, als die Behandlung mit den einzelnen Substanzen.

Passend zu diesen Ergebnissen konnte auch noch beobachtet werden, dass die kombinierte Proteasom-Inhibition und PPAR γ -Aktivierung zu einer stärkeren Reduzierung der Sekretion von IL-6 führt, verglichen mit der Inkubation mit den einzelnen Substanzen.

Als letztes wurden die Effekte der kombinierten Behandlung mit Troglitazone und Bortezomib auf die Induktion von endoplasmatischen Stress untersucht. Frühere Berichte haben gezeigt, dass PPAR γ -Agonisten die *Unfolded-Protein-Response* (UPR) auslösen können und somit zu der Initiierung einer Vielzahl von zytoprotektiven Mechanismen des endoplasmatischen Retikulums (ER) führen (Weber et al; 2004). Wenn diese Mechanismen die Zelle nicht mehr retten können, wird letztendlich eine ER-vermittelte Apoptose eingeleitet. Bortezomib kann die UPR nicht direkt aktivieren. Durch die Inhibition des Proteasoms können allerdings falsch gefaltete Proteine nicht mehr abgebaut werden und es kommt zu einer Akkumulation (Nawrocki et al; 2005). Dies führt dann zur Aktivierung der UPR und zur Induktion der PERK- und IRE-Signalwege, der Expression von ER-Chaperonen, dem Efflux von Calcium und der Aktivierung der ER-spezifischen Caspase-4.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Inkubation von NZK-Zelllinien mit Troglitazone und Bortezomib zu einer gesteigerten Induktion von ER-Stress führt, wie am Beispiel der Induktion des ER-Chaperons BiP und der Aktivierung der Caspase-4 dargelegt werden konnte.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Aktivierung von PPAR γ einen interessanten Ansatz für die Therapie des metastasierenden Nierenzellkarzinoms bei behandlungsresistenten Patienten darstellen könnte, wenn es mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib kombiniert wird.

6. Zusammenfassung

Die Aktivierung von PPAR γ , einem Transkriptionsfaktor der Hormon-Rezeptor-Superfamilie, führt zu Inhibition der Proliferation und des Zellwachstums und Induktion von apoptotischem Zelltod in einer Vielzahl von Tumoren.

Da beobachtet werden konnte, dass PPAR γ in verschiedenen Tumorproben von Nierenzellkarzinom (NZK)-Patienten überexprimiert ist, wurden die Auswirkungen von PPAR γ -Aktivierung auf NZK-Zelllinien untersucht. Die Zelllinien A498, CAKI-2 und MZ1774 wurden mit dem hochaffinen PPAR γ -Agonisten Troglitazone inkubiert und die Auswirkungen auf verschiedenen zellulären Ebenen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit Troglitazone zu einer verminderten Sekretion des im NZK überexprimierten autokrinen Wachstumsfaktor IL-6 führt, begleitet von einer Inhibition des MAP-Kinase Signalweges und einer reduzierten nukleären Expression der Transkriptionsfaktoren HIF1 α und NF- κ B. Außerdem hat die Inkubation der Zellen mit Troglitazone zu einer verminderten Expression der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-X_L, Survivin und Mcl-1 geführt. Diese Effekte traten nicht auf Grund von Apoptose auf, da CAKI-2- und MZ1774-Zellen fast resistent gegenüber apoptotischem Zelltod waren.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass der Proteasom-Inhibitor Bortezomib die PPAR γ -Aktivität in malignen Zellen erhöhen kann indem es seine Degradierung durch das Proteasom verhindert wird und RXR-Rezeptoren hochreguliert werden. Außerdem können beide Substanzen apoptotischen Zelltod über endoplasmatischen Stress auslösen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Bortezomib und Troglitazone die Apoptoseinduktion auch in denjenigen Zelllinien erhöht, die resistent gegenüber den einzelnen Substanzen sind. Dieser Effekt wurde von einer verstärkten Inhibition des MAPK-Signalweges, der Sekretion von Wachstumsfaktoren und der Expression von antiapoptotischen Molekülen begleitet. Außerdem führte die kombinierte Inkubation zu einer verstärkten Induktion von endoplasmatischem Stress.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Kombination von PPAR γ -Aktivierung und Proteasom-Inhibition ein neuer interessanter Ansatzpunkt für die Therapie von behandlungsresistenten Nierenzellkarzinom-Patienten darstellt.

7. Literaturverzeichnis

Adams J. (2002). Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. **7**: 9-16.

Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick LR, Grenier L et al. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **8**: 333-338.

Adams J, Palombella VJ, Elliott PJ. (2000). Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs* **18**: 109-121.

Aiello A, Pandini G, Frasca F, Conte E, Murabito A, Sacco A et al. (2006). Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* **147**: 4463-4475.

Alberti L, Thomachot MC, Bachelot T, Menetrier-Caux C, Puisieux I, Blay JY. (2004). IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines. *Int.J.Cancer* **111**: 653-661.

Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P. (2005). PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood* **106**: 3888-3894.

Blay JY, Negrier S, Combaret V, Attali S, Goillot E, Merrouche Y et al. (1992). Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **52**: 3317-3322.

Bukowski RM. (1997). Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer* **80**: 1198-1220.

Bukowski RM. (2008). What role do combinations of interferon and targeted agents play in the first-line therapy of metastatic renal cell carcinoma? *Clin.Genitourin.Cancer* **6**: s14-s21.

Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. (1990). Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* **12**: 1179-1186.

Chevillat JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. (2003). Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.* **27**: 612-624.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z et al. (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J.Biol.Chem.* **273**: 25573-25580.

Cho D, Signoretti S, Regan M, Mier JW, Atkins MB. (2007). The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer. *Clin.Cancer Res.* **13**: 758s-763s.

Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G et al. (2000). Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J.Biol.Chem.* **275**: 32681-32687.

Ciechanover A. (1993). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway. *Brain Pathol.* **3**: 67-75.

Ciechanover A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**: 13-21.

Cohen HT and McGovern FJ. (2005). Renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* **353**: 2477-2490.

Cortes J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S et al. (2004). Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin.Cancer Res.* **10**: 3371-3376.

Delahunt B and Eble JN. (1997). Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod.Pathol.* **10**: 537-544.

- Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N et al. (1999). Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 3951-3956.
- Desvergne B and Wahli W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr.Rev.* **20**: 649-688.
- Egger L, Madden DT, Rheme C, Rao RV, Bredesen DE. (2007). Endoplasmic reticulum stress-induced cell death mediated by the proteasome. *Cell Death.Differ.* **14**: 1172-1180.
- Escudier B, Cosaert J, Pisa P. (2008). Bevacizumab: direct anti-VEGF therapy in renal cell carcinoma. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **8**: 1545-1557.
- Evans RM. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**: 889-895.
- Gardner OS, Dewar BJ, Earp HS, Samet JM, Graves LM. (2003). Dependence of peroxisome proliferator-activated receptor ligand-induced mitogen-activated protein kinase signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J.Biol.Chem.* **278**: 46261-46269.
- Grandinetti CA and Goldspiel BR. (2007). Sorafenib and sunitinib: novel targeted therapies for renal cell cancer. *Pharmacotherapy* **27**: 1125-1144.
- Han S, Zheng Y, Roman J. (2007). Rosiglitazone, an Agonist of PPARgamma, Inhibits Non-Small Cell Carcinoma Cell Proliferation In Part through Activation of Tumor Sclerosis Complex-2. *PPAR.Res.* **2007**: 29632-
- Harris AL. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer* **2**: 38-47.
- Hayden MS and Ghosh S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**: 2195-2224.

- Hebbar M, Ychou M, Ducreux M. (2009). Current place of high-dose irinotecan chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*
- Hershko A. (2005). The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death.Differ.* **12**: 1191-1197.
- Horiguchi A, Oya M, Marumo K, Murai M. (2002). STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int.* **61**: 926-938.
- Hutson TE and Figlin RA. (2007). Evolving role of novel targeted agents in renal cell carcinoma. *Oncology (Williston.Park)* **21**: 1175-1180.
- Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG, Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat.Med.* **1**: 822-826.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M et al. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* **292**: 464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-472.
- Jung JY, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Park JY, Kim YK. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in troglitazone-induced osteoblastic cell death. *Toxicology* **234**: 73-82.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K et al. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**: 83-85.
- Kim EJ, Park KS, Chung SY, Sheen YY, Moon DC, Song YS et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits neuroblastoma cell growth through induction of apoptosis:

association with extracellular signal-regulated kinase signal pathway.

J.Pharmacol.Exp.Ther. **307**: 505-517.

Koeffler HP. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin.Cancer Res.* **9**: 1-9.

Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, Bacik J, Marion S, Russo P et al. (2004). Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* **22**: 3720-3725.

Lai E, Teodoro T, Volchuk A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology.(Bethesda.)* **22**: 193-201.

Lazarow PB. (1987). What is a peroxisome? *Toxicol.Ind.Health* **3**: 1-6.

Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. (2007). NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* **29**: 19-35.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J.Biol.Chem.* **270**: 12953-12956.

McLaughlin JK and Lipworth L. (2000). Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin.Oncol.* **27**: 115-123.

Ming M, Yu JP, Meng XZ, Zhou YH, Yu HG, Luo HS. (2006). Effect of ligand troglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and cellular growth in human colon cancer cells. *World J.Gastroenterol.* **12**: 7263-7270.

Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. (1997). Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J.Biol.Chem.* **272**: 4327-4334.

Motomura W, Tanno S, Takahashi N, Nagamine M, Fukuda M, Kohgo Y et al. (2005). Involvement of MEK-ERK signaling pathway in the inhibition of cell growth

by troglitazone in human pancreatic cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **332**: 89-94.

Motzer RJ, Bacik J, Mariani T, Russo P, Mazumdar M, Reuter V. (2002). Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *J.Clin.Oncol.* **20**: 2376-2381.

Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M et al. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol.Cell* **1**: 465-470.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der KJ, Stolarov JP, Hemmings BA et al. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 13513-13518.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* **93**: 229-240.

Narravula S and Colgan SP. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia. *J.Immunol.* **166**: 7543-7548.

Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K, Jr., Huang P et al. (2005). Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **65**: 11658-11666.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J.Immunol.Methods* **139**: 271-279.

Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F et al. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* **17**: 1475-1486.

Oberdorf J, Carlson EJ, Skach WR. (2001). Redundancy of mammalian proteasome beta subunit function during endoplasmic reticulum associated degradation. *Biochemistry* **40**: 13397-13405.

Oh S and Lim S. (2009). Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy/Apoptosis Induced by Capsaicin and Dihydrocapsaicin (DHC) is Regulated by the Extent of JNK/ERK Activation in WI38 Lung Epithelial Fibroblast Cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*

Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T et al. (1995). Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **55**: 4182-4187.

Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M. (2001). Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* **20**: 3888-3896.

Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K et al. (2003). Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **24**: 377-384.

Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. (1997). The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J.Biol.Chem.* **272**: 27509-27512.

Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW. (2006). The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* **66**: 1611-1619.

Papandreou CN and Logothetis CJ. (2004). Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res.* **64**: 5036-5043.

Parker AS, Kosari F, Lohse CM, Houston TR, Kwon ED, Murphy L et al. (2006). High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* **107**: 37-45.

Patel L, Pass I, Coxon P, Downes CP, Smith SA, Macphee CH. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr.Biol.* **11**: 764-768.

Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. (2005). Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J.Clin.Oncol.* **23**: 630-639.

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM et al. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J.Biol.Chem.* **276**: 33869-33874.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL et al. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol.Cell Biol.* **25**: 5675-5686.

Ray A and Prefontaine KE. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 752-756.

Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D et al. (2003). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N.Engl.J.Med.* **348**: 2609-2617.

Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Ou SS et al. (2008). Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J.Clin.Oncol.* **26**: 5422-5428.

Robson A and Collinson I. (2006). The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation. *EMBO Rep.* **7**: 1099-1103.

Schuringa JJ, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. (2000). Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood* **95**: 3765-3770.

Shang D, Liu Y, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. (2007b). Defective Jak-Stat activation in renal cell carcinoma is associated with interferon-alpha resistance. *Cancer Sci.* **98**: 1259-1264.

Shang D, Liu Y, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. (2007a). Defective Jak-Stat activation in renal cell carcinoma is associated with interferon-alpha resistance. *Cancer Sci.* **98**: 1259-1264.

Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A. (2002). Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* **50**: 658-664.

Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis* **28**: 529-536.

Soubrier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S et al. (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res.* **66**: 5130-5142.

Speicher MR, Schoell B, du MS, Schrock E, Ried T, Cremer T et al. (1994). Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol.* **145**: 356-364.

Stenzl A and deKernion JB. (1989). Pathology, biology, and clinical staging of renal cell carcinoma. *Semin.Oncol.* **16**: 3-11.

Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ et al. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am.J.Pathol.* **157**: 411-421.

Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin.Cancer Res.* **5**: 2638-2645.

Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, Chatterjee VK, Waite KA, Eng C. (2006). Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone. *Int.J.Cancer* **118**: 2390-2398.

Tsao WC, Wu HM, Chi KH, Chang YH, Lin WW. (2005). Proteasome inhibitors induce peroxisome proliferator-activated receptor transactivation through RXR accumulation and a protein kinase C-dependent pathway. *Exp.Cell Res.* **304**: 234-243.

Vogelzang NJ and Stadler WM. (1998). Kidney cancer. *Lancet* **352**: 1691-1696.

Wan H, Yuan Y, Qian A, Sun Y, Qiao M. (2008). Pioglitazone, a PPARgamma ligand, suppresses NFkappaB activation through inhibition of IkappaB kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomed.Pharmacother.* **62**: 466-472.

Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM et al. (2002). Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **277**: 34176-34181.

Wang T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **58**: 1-14.

Watson P and Stephens DJ. (2005). ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim.Biophys.Acta* **1744**: 304-315.

Weber SM, Chambers KT, Bensch KG, Scarim AL, Corbett JA. (2004). PPARgamma ligands induce ER stress in pancreatic beta-cells: ER stress activation results in attenuation of cytokine signaling. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **287**: E1171-E1177.

Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 13797-13801.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J.Med.Chem.* **43**: 527-550.

Wu J. (2002). On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a novel frontier in the development of immunosuppressants. *Am.J.Transplant.* **2**: 904-912.

Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K et al. (2002). VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* **94**: 1569-1575.

Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E et al. (1998). Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat.Genet.* **20**: 66-69.

8. Danksagungen

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die externe Betreuung meiner Arbeit und die vielfältigen Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Brossart bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas, eine exzellente Betreuung und die stetige Motivation. Auch in schwierigen Phasen der Arbeit konnte er einem Mut zusprechen und hat eine Arbeitsatmosphäre geschaffen, in der sich jeder Wohl fühlen konnte.

Für die großartige Hilfe bei der Bewältigung des Laboralltags und bei der Durchführung von Experimenten möchte ich mich bei Sylvia Stephan und Bruni Drotleff bedanken.

Frank Grünebach danke ich für seine wissenschaftlichen Ratschläge und Tipps.

Bei Katharina Duchardt und Markus Weck möchte ich mich für die großartige Zusammenarbeit und die praktische und theoretische Hilfe bei allen möglichen und unmöglichen Fragen bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Steffi Held, Solveig Daecke und Anita Bringmann bedanken. Sie haben immer ein offenes Ohr für Diskussionen und Fragen, nicht nur fachlich, sondern auch privat. Sie haben den Arbeitsalltag um einiges schöner gemacht und sind im Laufe der Zeit zu Freunden geworden. Außerdem haben sie mir den Anfang in Bonn um einiges leichter gemacht.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken. Nur durch ihre bedingungslose Unterstützung und ihren Rückhalt konnte ich meine Ziele verwirklichen.

Bei Michael möchte ich mich für seine Unterstützung bedanken und dass er immer da war, wenn ich ihn gebraucht habe.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 03. Januar 1980
Geburtsort: Petare/Venezuela
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulstudium

- 03/2006 – 08/2009 Promotion im Fach Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen, angefertigt am Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie und am Universitätsklinikum Bonn, Abteilung für Hämatologie und Onkologie.
Gutachter: Prof. Dr. rer.nat. Hans-Georg Rammensee und Prof. Dr. med. Peter Brossart
- 10/2000 – 12/2005 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen.
Anfertigung der Diplomarbeit am Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie.
Gutachter: Prof. Dr. rer.nat. Hans-Georg Rammensee und Prof. Dr. med. Peter Brossart

Auslandsaufenthalte

09/1999 – 09/2000 *Work and Travel* in Galway/Irland

Schulbildung:

1999 Abitur
09/1990 – 07/1999 Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck
08/1986 – 07/1990 Grundschule Emmering

10. Publikationsliste

Von Schwarzenberg K, Held SAE, Schaub A, Brauer KM, Bringmann A, Brossart P; Proteasome Inhibition overcomes the resistance of renal cell carcinoma cells towards the PPAR γ ligand troglitazone; **Cell Mol Life Sci**, 2009

Brauer KM, Werth D, von Schwarzenberg K, Bringmann A, Kanz L, Grünebach F, Brossart P; BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells; **Cancer Research**, 2007

Bringmann A, Schmidt SM, Weck MM, Brauer KM, von Schwarzenberg K, Werth D, Grünebach F, Brossart P; Zoledronic acid inhibits the function of Toll-like receptor 4 ligand activated monocyte-derived dendritic cells; **Leukemia**, 2007

Nencioni A*, Schwarzenberg K*, Brauer KM, Schmidt SM, Ballestrero A, Grünebach F, Brossart P; Proteasome Inhibitor Bortezomib modulates TLR-4 induced Dendritic cell activation; **Blood**, 2006

Nencioni A, Garuti F, Schwarzenberg K, Cirmena G, Dal Bello G, Rocco I, Barbieri E, Brossart P, Patrone F, Ballestrero A; Proteasome-inhibitor induced apoptosis in human monocyte derived dendritic cells; **Eur. Jour. Immunol.**, 2006

* Gleichwertige Erstautorenschaft (contributed equally)