

**„Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Resistenz
von Nierenzellkarzinomen gegenüber Chemotherapeutika“**

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Beate Henzgen
geboren am 24.05.1977 in Jena

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Thomas Steiner, Chefarzt der Klinik für Urologie, Helios-Klinikum Erfurt
2. PD Dr. rer. nat. Marion Hippus, Leiterin AB Klinische Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. med. Dirk Reinhold, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Otto von Guericke-Universität Magdeburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.05.2012

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	activator protein 1
Aqua dest.	Aqua destilata
ASI	aktiv-spezifische Immuntherapie
BAY	BAY 11-7082
bzw.	beziehungsweise
c _{1,2,3}	Konzentrationsangaben mit zusätzlichem vorstehendem Index für die jeweils verwendete Substanz (Kapitel 4.2.2 und 4.3.4)
CAPE	Caffeic acid phenylethyl ester
CMV	Cytomegalievirus
DNS/DNA	Desoxiribonukleinsäure („desoxy-ribo-nucleic acid“)
Dox	Doxorubicin
EAU	European Association of Urology
FADD	Fas-associated protein with Death Domain
FKS	fötale Kälberserum
5-FU	5-Fluorouracil
Gem	Gemcitabin
GFP	Green fluoreszent protein
IFN- α	Interferon- α
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
K	Kontrolle
KV	Kristallviolett
LPS	Lipopolysaccharide
MEKK	mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
m-TOR	mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localisation signal

I Abkürzungsverzeichnis

NZK	Nierenzellkarzinom
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung („phosphate-buffered saline“)
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol ester
RNS	Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor

II Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis

II Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	4
2.1 Das Nierenzellkarzinom	4
2.1.1 Epidemiologie.....	4
2.1.2 Ätiologie	4
2.1.1 Pathologie	5
2.1.2 Prognose	8
2.1.3 Therapie	9
2.1.3.1 Chirurgische Therapie	9
2.1.3.2 Zytostatische Chemotherapie	10
2.1.3.3 Unspezifische Immuntherapie	10
2.1.3.4 Zielgerichtete Therapien	12
2.1.3.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	12
2.1.3.4.2 m-TOR-Inhibitoren (mammalian target of rapamycin inhibitor)	12
2.1.3.5 Aktiv-spezifische Immuntherapie (ASI)	13
2.1.3.6 Hormontherapie.....	14
2.1.3.7 Strahlentherapie.....	15
2.1.3.8 Tumorembolisation	15
2.2 Faktoren, die das Ansprechen der Nierenzellkarzinome auf biologische und chemische Faktoren beeinflussen	15
2.2.1 Wirkungsmechanismen der eingesetzten Zytostatika.....	15
2.2.1.1 5-Fluorouracil.....	15
2.2.1.2 Doxorubicin.....	16
2.2.1.3 Caelyx (Doxorubicin-HCl).....	16
2.2.1.4 Gemcitabin (2',2'-Difluorodeoxycytidine)	16
2.2.2 Apoptosemechanismen	16
2.2.2.1 Derepressionsapoptose	17
2.2.2.2 Aktivierungsapoptose.....	17
2.2.3 Nuclear factor –kappa B (NF-κB)	18

1 Zusammenfassung

2.2.3.1	Aufbau, Eigenschaften und Funktion des NF- κ B	18
2.2.3.2	NF- κ B- induzierte Gene und deren Wirkung.....	20
2.2.3.3	NF- κ B-Inhibitoren.....	21
2.2.3.3.1	Caffeic acid phenylethyl ester (CAPE).....	21
2.2.3.3.2	Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC)	22
2.2.3.3.3	BAY 11-7082 (BAY).....	22
2.2.4	Zytokine.....	22
2.2.4.1	TNF- α	22
2.2.4.2	IFN- α	23
3	Ziele der Arbeit	25
4	Material und Methoden	26
4.1	Aufbereitung der Zellkulturen	26
4.1.1	Kultur permanenter Zelllinien	26
4.1.1.1	HT-29	26
4.1.1.2	A498.....	26
4.1.2	Kultivierung von primären Nierenzellkarzinomen.....	26
4.1.3	Aufbewahrung der Kulturen.....	27
4.2	Stimulationsexperimente mit NF- κ B-Inhibitoren, Zytostatika und Zytokinen ...	27
4.2.1	Vorbereiten der Zellen für die Stimulation.....	27
4.2.2	Stimulation mit NF- κ B-Inhibitoren, Zytostatika und Zytokinen	27
4.2.3	Stoffwechselumsatzmessung mittels XTT	29
4.2.4	Proteinmengenbestimmung mittels Kristallviolett.....	29
4.3	Transfektionsexperimente	30
4.3.1	Vorbereiten der Zellen für die Transfektion.....	30
4.3.2	Transfektion.....	30
4.3.3	Beschreibung der genutzten Vektoren.....	30
4.3.4	Stimulation mit IL-2, IFN- α und Zytostatika pCMVINp65- und pPMECMV κ B transfizierter Zellen.....	31
4.3.5	Fixieren der Zellen mit PFA und Hoechst.....	32
4.3.6	Mikroskopische Auswertung.....	32
4.4	Liste verwendeter Lösungen.....	34
5	Ergebnisse	36
5.1	Stimulation der Zellkulturen mit NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika	36
5.1.1	Untersuchungen an permanenten HT 29 und A498 Zelllinien.....	36

1 Zusammenfassung

5.1.1.1	HT29 im XTT-Stoffwechselumsatz.....	36
5.1.1.2	HT29 in der Kristallviolett-färbung.....	37
5.1.1.3	Vergleich von XTT und Kristallviolett.....	38
5.1.1.4	A498 im XTT- Stoffwechselumsatz.....	38
5.1.1.5	A498 in der Kristallviolett-färbung.....	39
5.1.1.6	Vergleich von XTT und Kristallviolett.....	40
5.1.2	Untersuchungen an primären Nierenzellkarzinom-Zelllinien.....	40
5.1.2.1	Effekte der Zytostatika.....	40
5.1.2.2	Effekte der NF- κ B- Inhibitoren.....	41
5.1.2.3	Ergebnisse der Kombination von Inhibitoren und Zytostatika.....	44
5.1.2.3.1	Stoffwechselumsatzmessung mittels XTT.....	46
5.1.2.3.2	Proteinmengenbestimmung mittels Kristallviolett.....	56
5.1.2	Untersuchungen an primären Nierenzellkarzinom-Zelllinien.....	40
5.2	Stimulation der transfizierten Primärkulturen mit IL-2, IFN- α und Zytostatika.....	64
5.2.1	pPMECMV κ B- transfizierte Zelllinien.....	65
5.2.2	pCMVINp65- transfizierte Zelllinien.....	67
5.2.3	Zusammenfassung der Experimente mit transfizierten Zellen.....	68
6	Diskussion.....	70
6.1	Untersuchungen mit NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika.....	70
6.1.1	Die einzelnen Effektoren.....	70
6.1.2	Effekte der Kombinationen.....	75
6.1.3	Die Nachweismethoden.....	78
6.2	Immunchemotherapie unter Regulierung von NF- κ B durch Transfektion.....	79
7	Schlußfolgerungen.....	82
	Literaturverzeichnis.....	84
	Danksagung.....	98
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	99

1 Zusammenfassung

Die Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen gestaltet sich schwierig. Die einzig kurative Therapieoption ist die vollständige Entfernung des Tumors. Alle anderen Therapieformen haben lediglich palliativen Charakter. Durch die vom MDR1-Gen vermittelte „Multi drug resistance“ sind die Tumore der Chemotherapie nur schwer zugänglich. Die bisher favorisierte Therapie war die Immunchemotherapie mit kombinierter Gabe von IFN- α , IL-2 und 5-Fluorouracil. Diese wurde in den letzten Jahren durch zielgerichtete Therapeutika (Tyrosinkinaseinhibitoren und m-TOR-Inhibitoren) ersetzt, die jedoch ebenfalls nur palliativ einsetzbar sind, so dass weitere Untersuchungen zur Verbesserung des Überlebens der Patienten notwendig werden.

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der mittels unterschiedlicher Mechanismen die Zellen vor apoptotischen Stimuli schützt und sich so positiv auf das Überleben der Zellen auswirkt. Verschiedene Studien haben die erhöhte Sensitivität gegenüber Apoptose durch *Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in verschiedenen Zelltypen gezeigt. Im Gegensatz dazu weisen andere Untersuchungen NF- κ B jedoch auch die Potenz zur Apoptoseinduktion nach.

Es werden derzeit verschiedene NF- κ B-Inhibitoren untersucht, deren konkrete Wirkungsweise meist noch nicht klar ist, die jedoch nachweislich die NF- κ B-Aktivität senken. Ziel unserer Untersuchungen war es, durch negative Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität das Ansprechen auf Zytostatika bei Zellkulturen von primären Nierenzellkarzinomen zu verbessern.

Den weitaus größten Teil der Arbeit nahm die Hemmung der NF- κ B-Aktivität mittels verschiedener Inhibitoren (BAY, CAPE, PDTC) und der nachfolgenden Behandlung mit Zytostatika (Doxorubicin, 5-Fluorouracil und Gemcitabin) ein. Zusätzlich wurden die Zytokine TNF- α und IFN- α untersucht.

Dabei fand sich ein deutliches Ansprechen der Zellen auf Doxorubicin, welches zu einer hohen Apoptoseinduktion in nahezu allen untersuchten Tumorzelllinien führte. Eine zusätzliche Abnahme der Zellen nach Vorbehandlung mit IFN- α war in einigen Fällen zu verzeichnen. Das in der klinischen Anwendung lange favorisierte 5-Fluorouracil zeigte

1 Zusammenfassung

eine wesentlich geringere Wirksamkeit auch nach Vorbehandlung mit entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren.

Von den NF- κ B-Inhibitoren zeigte BAY die stärkste Wirkung auf fast alle Tumorzelllinien. Die nachfolgende Zytostatikabehandlung hatte hier meist keinen zusätzlichen Effekt. Bei den anderen untersuchten potentiellen NF- κ B-Inhibitoren scheinen zusätzlich bisher unbekannte Stoffwechselforgänge eine Rolle zu spielen, da hier neben einer Apoptoseinduktion bei einigen Zelllinien auch ein Proliferationsreiz nachzuweisen war.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin, den Einfluss von NF- κ B-Aktivierung und NF- κ B-Hemmung auf die Immunchemotherapie und eine mögliche Umgehung der „Multi drug Resistance“ zu untersuchen. Dazu wurden die Zellkulturen der primären Nierenzellkarzinome mit einem konstitutiv aktiven Plasmid (p65) bzw. einem dominant negativen I κ B-Plasmid transfiziert und nachfolgend mit Immunchemotherapie behandelt. Neben 5-Fluorouracil wurden auch Doxorubicin und Caelyx, eine Liposomenzubereitung des Doxorubicins, was in klinischen Studien zu einer besseren Verträglichkeit führt, untersucht. Die transfizierten Zellen wurden hinsichtlich der Apoptoserate mittels spezieller Färbetechniken unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Hierbei kam kein Assay zum Einsatz. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der mit p65 bzw. I κ B-transfizierten Zellen in der Ansprechbarkeit auf Immunchemotherapie. Allerdings zeigte sich auch hier ein 100%-iges Ansprechen der Zellen auf die Doxorubicinbehandlung. Die lange genutzte 5-Fluorouracil-Immunchemotherapie führte nur bei einem Drittel der untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Apoptoseinduktion. Bei den Zelllinien, die primär auf eine Monotherapie mit einem der untersuchten Zytostatika ansprechen, konnte durch die Kombinationstherapie eine weitere Verbesserung erreicht werden. Zellen, die primär auf Chemotherapie nicht ansprechen, zeigten auch keine Apoptoseinduktion bei zusätzlicher Zytokingabe.

Eine in-vitro- Behandlung von primären Nierenkarzinomzelllinien mit Doxorubicin führt zu einer deutlichen Apoptoseinduktion, wahrscheinlich durch eine direkt toxische Wirkung. Die relativ schlechtere Ansprechrate der Zellen auf 5-Fluorouracil, welches nach klinischem Kenntnisstand Doxorubicin überlegen ist, lässt sich möglicherweise auf eine zu kurze Inkubationszeit zurückführen, so dass ein effektiver Wirkungseintritt aufgrund der Wirkprinzipien von 5-Fluorouracil nicht möglich war.

1 Zusammenfassung

Eine Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität kann bei einigen Zelllinien zu einem deutlich verbesserten Ansprechen der Zellen führen, so dass ein Zusammenhang der NF- κ B-Aktivität bei Behandlung von primären Nierenzellkarzinomen wahrscheinlich ist. Bei noch nicht sicher geklärten Wirkmechanismen der NF- κ B-Inhibitoren sind weitere Untersuchungen notwendig.

Einleitung

Das Nierenzellkarzinom

Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste Tumor der Niere, jedoch mit einem Anteil von 2-3% (Mc Laughlin und Lipworth 2000, Jemal et al. 2005) aller soliden Tumoren eher selten. Die Inzidenz nimmt weltweit zu; in Deutschland ist pro Jahr mit 11.000 bis 12.000 Neuerkrankungen zu rechnen, das entspricht etwa 7-8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Bichler und Wechsel 1999, Mirghomizadeh et al. 1999, Schumacher 2000). Im bundesdeutschen Krebsregister nimmt es bei Männern den 10., bei Frauen den 14. Platz ein (Bichler und Wechsel 1999), im europäischen Krebsregister steht es an 9. Stelle (Ferlay et al. 2008). Männer sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen; das Prädilektionsalter liegt in der 5.-7. Lebensdekade (Bichler und Wechsel 1999, Schumacher 2000, Mc Laughlin und Lipworth 2000).

Ätiologie

Die Histogenese des Nierenzellkarzinoms war lange umstritten. Die Theorien von Grawitz (1883), es handle sich um gutartige Geschwülste dysontogenetischen Ursprungs, und Sudeck (1893), der von der Entwicklung aus einem Adenom der Harnkanälchen ausging, konnten erst durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Oberling (Oberling et al. 1960) bzw. Seljelid und Ericsson (Seljelid und Ericsson 1965) widerlegt werden. Sie zeigten, dass sowohl das Nierenzellkarzinom als auch die Adenome in der Regel aus dem proximalen Tubulusepithel hervorgehen. Histochemische und immunhistologische Untersuchungen von Braunstein und Adelman (Braunstein und Adelman 1966), Tannenbaum (Tannenbaum 1971) sowie Wallace und Nairn (Wallace und Nairn 1972) bestätigten diese Erkenntnisse.

Gesicherte Risikofaktoren sind Zystennieren, eine chronische Niereninsuffizienz, die von Hippel-Lindau'sche Krankheit und eine positive Familienanamnese. Auch allgemeine Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Übergewicht, Analgetikaabusus (Phenacetinnieren), arterielle Hypertonie, sowie hormonelle Faktoren (z.B. bei Multipara) und die Exposition zu Kadmium, Blei, Asbest und aromatischen Kohlenwasserstoffen scheinen eine Rolle zu spielen.

0 Einleitung

Zytogenetisch wurden typische chromosomale Aberrationen (Deletion 3p für klarzellige Nierenzellkarzinome, Trisomie 7,8,12,17, Translokation t 3:8 und t 3:11), Aktivierung von Onkogenen (*MYC*, *FMS*, *ERBB1*) und Hemmung von Tumorsuppressorgenen wie p53 beschrieben (Mirghomizadeh et al. 1999, Mc Laughlin und Lipworth 2000, Godley und Ataga 2000).

1.1.1 Pathologie

Solide Tumoren der Niere sind zu 95% Nierenzellkarzinome und bis zu 5% Onkozytome, welche nicht metastasieren und eine gute Prognose haben; selten (<1%) kommen Sarkome und Lymphome vor. Die morphologische Typisierung unterscheidet klarzellige Karzinome (80%) von chromophilen (10-15%) und chromophoben (5%) Tumoren. Der chromophobe Typ geht vom distalen Tubulus aus und hat eine bessere Prognose als der klarzellige und der chromophile Typ. Die histopathologischen Nierenzellkarzinomtypen sind in Tabelle 1 dargestellt und beschrieben.

0 Einleitung

Tabelle 1: Übersicht über die histopathologischen Nierenzellkarzinomtypen nach Thoenes (Thoenes 1991)

Nierenzellkarzinomtyp	Häufigkeit	Beschreibung
Klarzelliges NZK	75%	Helles transparentes Zytoplasma im HE-Schnitt. Elektronenmikroskopisch zeigt es als Ursache der Zytoplasmatransparenz die Herauslösung von Glycogen und Fett.
Chromophilzelliges NZK	11%	Geht im Wesentlichen vom proximalen Tubulus aus, ebenso wie die klarzelligen Karzinome
Chromophobzelliges NZK	5%	In erster Linie vom distalen Tubulus bzw. vom Verbindungsstück zwischen Metanephros und Ureterknospe ausgehend; im HE-Schnitt ebenfalls mit hellen und transparenten Zytoplasmen, die elektronenmikroskopisch auf der Ansammlung zahlreicher membranöser Vesikel im Zytoplasma beruhen.
Onkozytom	5%	Geht ebenso vom Verbindungsstück zwischen Metanephros und Ureterknospe aus. Es wird als nicht maligner Nierenzelltumor angesehen.
Duct-Bellini-Karzinom	1%	Dieser insgesamt seltene Tumor geht von den Hauptzellen insbesondere des medullären Sammelrohres aus.

Die pathologische Beschreibung umfasst neben der Typisierung auch das Grading (Grad I-III; Grad I entspricht einem gut differenzierten, Grad III einem anaplastischen Tumor) und die Stadienerfassung nach dem TNM-System. Neben dem TNM-System (UICC 1997) ist die amerikanische Einteilung nach Robson (Robson-Klassifikation von 1969) besonders im angloamerikanischen Raum gebräuchlich. In Tabelle 2 findet sich die Gegenüberstellung der beiden Klassifikationen.

0 Einleitung

Tabelle 2: Vergleich der Klassifikationen von Nierenzellkarzinomen (Robson und TNM)

Robson	TNM (2009)	Beschreibung
I	T1, N0, M0	Tumor ≤ 2 cm (Robson) bzw. ≤ 7 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
	T2a, N0, M0	Tumor > 2 cm (Robson) bzw. > 7 cm und < 10 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
	T2b, N0, M0	Tumor > 2 cm (Robson) bzw. > 10 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
II	T3a, N0, M0	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe (Fettkapsel), Gerotafaszie wird nicht überschritten, Ausbreitung in die Nierenvenen möglich Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
IIIa	T3b, N0, M0	Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
	T3c, N0, M0	Tumor mit Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
	T4, N0, M0	Tumor infiltriert über die Faszie von Gerota hinaus, Infiltration der Nebennieren (Robson: ohne Beteiligung von Nachbarorganen) Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen
IIIb	T1-3a, N1-2, M0	Metastase in einem (TNM: N1) oder mehreren (TNM: N2) regionären Lymphknoten Keine Fernmetastasen
IIIc	T3b-4, N1-2, M0	Veneninvasion zusammen mit regionären Lymphknotenmetastasen (Kombination von Robson IIIa und IIIb)
IVa	T4, N1-2, M0	Organüberschreitendes Tumorwachstum mit Infiltration in Nachbarorgane
IVb	T1-4, N1-2, M1	Fernmetastasen

0 Einleitung

Die Metastasierung erfolgt vor allem in die Lunge (50-60)%, in die Knochen (30-40%), die Leber (30-40%) und ins Gehirn (5%), selten in Pankreas, Nebenniere und Parotis.

Prognose

Von entscheidender Bedeutung für die Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinom ist die Frage, ob es sich um einen lokal begrenzten oder einen bereits metastasierten Tumor handelt. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit bei primärer Metastasierung (30-50% der Fälle) (Bichler und Wechsel 1999, Schumacher 2000) beträgt ein Jahr nach Diagnosestellung nur etwa 5%. Weitere 30-50% entwickeln im Verlauf eine metastasierte Erkrankung (Franklin et al. 1996, Hartmann und Bokemeyer 1999). Wichtige Prognosefaktoren sind neben der Metastasierung auch Tumorgöße, Tumorausdehnung und der Differenzierungsgrad. Durch verbesserte diagnostische Maßnahmen wie Computertomographie und Sonographie verringerte sich in den vergangenen Jahren der Anteil der fortgeschrittenen bzw. metastasierten Tumoren zugunsten kleinerer und noch auf die Niere beschränkter Nierenzellkarzinome. Hierbei stieg der Anteil zufällig entdeckter Tumore von 4-23% in den 70-er Jahren auf 70-75% zum heutigen Zeitpunkt (Schlichter et al. 1999, Fischer 1999). Dies hat dazu beigetragen, die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten 20 Jahren um 10% auf nunmehr 60% zu steigern (Bono und Lovisolo 1997).

Die unten stehende Tabelle (Tabelle 3) verdeutlicht die Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebensrate von der Tumorausbreitung (Hermanek und Schrott 1990, Bichler und Wechsel 1999, Schumacher 2000).

Tabelle 3: 5-Jahres-Überlebensraten beim Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Stadium	Überleben	Stadium	Überleben
T1 N0 M0	98%	T4 N0 M0	5-15%
T2 N0 M0	80-85%	TX N1 M0	20%
T3a N0 M0	60-65%	TX NX M1	< 5%
T3b/c N0 M0	40-50%		

0 Einleitung

Außerdem ist für die Prognose des Patienten auch eine Vielzahl anderer Faktoren wichtig, wie der Allgemeinzustand des Patienten, die Zeit zwischen Diagnosestellung und dem Auftreten von Metastasen, die Blutsenkungsgeschwindigkeit und mit Einschränkungen das Haptoglobin, das C-reaktive Protein sowie andere Akutphase-Proteine. Zusätzlich sind die Anzahl der Metastasen sowie deren Lokalisation ebenfalls von prognostischer Bedeutung. Es ist jedoch immer die intratumorale Heterogenität individueller Nierenzellkarzinome zu bedenken (Henzler et al. 1992).

Von Motzer wurde ein Prognosenscore erarbeitet, der zur Stratifizierung von Studien mit neuen Substanzen herangezogen wird. Darin gehen der Karnofsky-Index, eine LDH-Erhöhung, das Serum-Calciums, der Hämoglobinwert und die Zeitspanne von der Diagnosestellung bis zum Beginn einer IFN- α -Therapie ein.

Der prognostische Wert der MDR-1-Expression der Nierenzellkarzinome wird heute noch kontrovers diskutiert (Oudard et al. 2002, Mignogna et al. 2006). Einige Autoren sehen neben der Resistenz gegenüber Zytostatika auch einen Zusammenhang zwischen Stärke der Expression und Tumoraggressivität bzw. Differenzierung.

Therapie

Die komplette chirurgische Entfernung des Tumorgewebes stellt die einzige potenziell kurative Behandlungsmöglichkeit dar. In den Stadien T1 und T2 können so hohe Heilungsraten erzielt werden. Tumore höherer T-Kategorien haben ein hohes Progressionsrisiko, bei Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen ist die Prognose infaust.

Alle anderen therapeutischen Maßnahmen wie Chemo-, Immun-, Hormon- und Strahlentherapie haben bislang nur palliativen Charakter.

Chirurgische Therapie

Die radikale Tumornephrektomie gilt bei nicht metastasiertem Nierenzellkarzinom und gesunder kontralateraler Niere als Standardtherapie. Die Nierenteilresektion bei lokal begrenzten Tumoren hat eine der radikalen Chirurgie entsprechende Prognose (Peycelon et al. 2009) und wird generell für T1-Tumore empfohlen. Bei anatomischen oder funktionellen Einzelniere besteht eine absolute Indikation zur Teilresektion, bei eingeschränkter Nierenfunktion eine relative Indikation.

0 Einleitung

Bei lokal fortgeschrittenem Tumorleiden, ungünstiger Lokalisation sowie schlechtem Allgemeinzustand ist jedoch die radikale Nephrektomie entweder offen chirurgisch oder aber laparoskopisch vorzuziehen (Luo et al. 2010).

Adjuvante Therapien nach potenziell kurativem Eingriff außerhalb klinischer Studien sind abzulehnen, da sie dem Patienten keinen zusätzlichen Benefit bringen.

Im Falle des metastasierten Karzinoms konnte in zwei randomisierten Studien eine Verlängerung der Überlebenszeit nachgewiesen werden, wenn die Patienten sich einer Nephrektomie unterzogen im Vergleich zu den nicht operierten Patienten (Flanigan et al. 2004). Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom und solitärer Metastase erfolgt primär die Tumornephrektomie und nachfolgend die Resektion der Metastase.

Diskutiert wird die Wertigkeit der Tumornephrektomie bei synchroner Metastasierung. Das bisherige Behandlungsregime sah hier eine Indikation zur Nephrektomie nur bei einer durch den Tumor bedingten Symptomatik wie Blutungen oder Schmerzen gegeben. In einer prospektiv randomisierten Studie von Mickisch (Mickisch et al. 2000) wurde jedoch bei tumornephrektomierten Patienten unter IFN- α -Immuntherapie gegenüber alleinig immuntherapierten Patienten ein Überlebensvorteil von 17 versus 7 Monaten erreicht. Nach den neuen Empfehlungen der „European Association of Urology“ (EAU) sollte die Entfernung der Metastase zur Verbesserung der Prognose des Patienten angestrebt werden (Ljungberg et al. 2010).

Zytostatische Chemotherapie

Die bislang untersuchten Substanzen (z.B. Vinblastin, 5-Fluorouracil, Cyclophosphamid, Cisplatin) sind vermutlich unter anderem auf Grund der „Multi drug resistance“, vermittelt durch das MDR 1-Gen, nicht effektiv und verbesserten die Prognose der Patienten nicht (Mickisch et al. 1990). Eine Metaanalyse von 83 Phase-2-Studien im Zeitraum von 1983 bis 1993, in denen vorwiegend mit Monosubstanzen behandelt worden war, zeigte ein Gesamtansprechen von 6%, davon 1,3% mit „kompletter Remission“. Lediglich bei 5-Fluorouracil und Vinblastin sind Ansprechraten von mehr als 10% beschrieben. Deshalb wurden diese Substanzen lange in der Immunchemotherapie eingesetzt (siehe unten).

Unspezifische Immuntherapie

Die schlechte Prognose der metastasierten Nierenzellkarzinome konnte in den vergangenen 30 Jahren auch mittels Immuntherapie nur wenig verbessert werden. Bisher wurde noch

0 Einleitung

kein Prädiktor für das Ansprechen auf Immuntherapie gefunden werden. Man unterscheidet Monotherapieansätze von Kombinationstherapien.

Von den bisher untersuchten Zytokinen werden vor allem IFN- α und IL-2 eingesetzt.

Im europäischen Raum wurden Studien überwiegend mit IFN- α - Monotherapien durchgeführt, bei deren Zusammenfassung sich eine Gesamt-Response-Rate von 6-15% ergab und eine signifikante Verlängerung der Lebenszeit von 3 bis 5 Monaten nachgewiesen werden konnte (Pyrhönen et al. 1999, Coppin et al. 2005).

In den USA wurde trotz schwerer Nebenwirkungen und widersprüchlicher Ergebnisse die Hochdosistherapie mit IL-2 favorisiert, wobei ein positiver Effekt auf die Lebenszeitverlängerung noch nicht bewiesen ist (Rosenberg et al. 1987, Jones et al. 1993).

Die favorisierte Kombinationstherapie bestand in Deutschland seit 1994 aus subcutan appliziertem IL-2 gefolgt von IFN- α und der intravenösen Gabe von 5-Fluorouracil. Insgesamt ist festzustellen, dass die vielfältig veröffentlichten Ergebnisse weit auseinander gehen. Atzpodien (Atzpodien et al. 1996) erzielten Ansprechraten von 39%. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Joffe (Joffe et al. 1996), die neben geringeren Ansprechraten von nur 17% partiellen Remissionen auch gravierende Nebenwirkungen angaben. Eine Übersicht über einige andere Studien mit unterschiedlichen eingesetzten Substanzen und deren Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Zusammengefasst ergaben sich dennoch Gesamtansprechraten von über 20%, wobei die Patientenselektion eine maßgebliche Rolle zu spielen scheint. Atzpodien erarbeitete einen Risikoscore, welcher verschiedene klinische Parameter umfasst und Aussagen über das individuelle Risiko bezüglich des Tumorprogresses machen soll. Er teilte die Patienten somit drei prognostischen Gruppen zu. In der günstigsten Gruppe wurde ein medianes Gesamtüberleben von 32 Monaten erreicht (5-Jahre-Überlebensrate 27%), in der mittleren Gruppe 18 Monate mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 11% und in der Hochrisikogruppe 8 Monate (5-Jahres-Überlebensrate 5%) (Atzpodien et al. 2003).

Tabelle 4: Immun(chemo)therapie (modifiziert nach (Chan und Marshall 1998))

Referenz	n=	Zytokine	CR/PR
Gebrosky 1997	21	5-FU & IFN- α -2b	4/5 (43%)
Buzi 1997	21	IL-2 & IFN- α	1/3 (17%)
Savage 1997	24	5-FU & IL-2	1/3 (17%)
Hofmockel 1997	23	IFN- α -2b	0/1 (4%)
Negrier 1998	138	IL-2	1/3 (3%)
Negrier 1998	147	IFN- α -2a	2/7 (6%)
Negrier 1998	140	IL-2 & IFN- α -2a	5/14 (14%)

Zielgerichtete Therapien

Tyrosinkinase-Inhibitoren

Eine neue Therapie stellen die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib dar, deren Zulassung im August 2006 in Deutschland für das metastasierte Nierenzellkarzinom erfolgte. Durch diese werden die für das Einsprossen der Blutgefäße in den Tumor notwendigen Wachstumsfaktoren selbst oder deren Rezeptoren blockiert. Durch das Entziehen der Nahrungsgrundlage wird das Wachstum des Tumors unterdrückt (Motzer und Bukowski 2006, Larkin und Eisen 2006).

Sunitinib wird in der First-line Therapie von Patienten mit niedrigem oder mittlerem Risiko nach Motzer-Score eines metastasierten Nierenzellkarzinoms eingesetzt. Im Vergleich mit der IFN- α -Monotherapie wurde ein längeres progressionsfreies Überleben der Patienten von 11 versus 5 Monaten erreicht (Motzer et al. 2009). Das Gesamtüberleben wurde hierbei auf 28,1 Monate unter Sunitinib versus 14,1 Monate unter IFN- α erhöht.

Sorafenib wird in der Second-line Therapie eingesetzt nach vorheriger Immuntherapie bzw. bei Patienten, die für eine Immuntherapie ungeeignet sind. Im Vergleich zu Placebo konnte das progressionsfreie Überleben um 3 Monate verlängert werden (Escudier et al. 2007).

Pazopanib ist ein oraler Angiogeneseinhibitor, der auf den VEGF-Rezeptor, den PDGF-Rezeptor und c-KIT zielt. In einer Studie konnte das progressionsfreie Überleben der Patienten im Vergleich zu Placebo von 4,2 auf 9,2 Monate gesteigert werden (Sternberg et al. 2010).

0 Einleitung

Ebenfalls bei Niedrigrisikopatienten und Patienten mit mittlerem Risiko nach dem Motzer-Score wird Bevacizumab (ein VEGF-Antikörper) in der Kombination mit IFN- α für die First-line-Therapie von der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) empfohlen (Ljungberg et al. 2010).

m-TOR-Inhibitoren (mammalian target of rapamycin inhibitor)

Die Überaktivierung von m-TOR spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms. Ursächlich hierfür ist eine Deregulierung verschiedener upstream von m-TOR lokalisierter Signaltransduktionswege durch Mutation verschiedener Proteine. Bei Hochrisikopatienten nach Motzer-Score wird in der First-line-Therapie mit dem m-TOR-Inhibitor Temsirolimus behandelt. Hier konnte in einer Studie das Gesamtüberleben im Vergleich zur Monotherapie mit IFN- α von 7,3 Monaten auf 10,9 Monate gesteigert werden. Die Kombinationstherapie erbrachte keinen zusätzlichen Nutzen (Hudes et al. 2007).

Ein weiterer m-TOR-Inhibitor ist Everolimus, der in der Second-line-Therapie eingesetzt wird. Hier konnte in einer Studie von Motzer und Kollegen das mediane progressionsfreie Überleben von 1,9 Monaten bei Placebo auf 4 Monate mit Everolimus gesteigert werden (Motzer et al. 2008)

Inzwischen gibt es die generelle Empfehlung für den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren und m-TOR-Inhibitoren in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms. Tabelle 5 fasst die aktuellen Empfehlungen der EAU zusammen.

Die Therapie mit diesen Substanzen ist noch in der Entwicklung. Es gibt keine Daten, die auf einen kurativen Effekt hinweisen, sie scheinen die Tumore jedoch zu stabilisieren.

Tabelle 5: EAU-Guidelines 2010 zum Einsatz der zielgerichteten Therapien

Behandlung	Risiko (Motzer-Score) oder vorherige Behandlung	Empfohlene Substanz
First line	Niedriges oder mittleres Risiko	Sunitinib Bevacizumab plus IFN- α Pazopanib
	Hohes Risiko	Temsirolimus
Second line	Vorherige Zytokintherapie	Sorafenib Pazopanib
	Vorherige Tyrosinkinaseinhibitortherapie	Everolimus
	Vorherige m-TOR-Inhibitor-Therapie	Klinische Studien (Grad C)

Aktiv-spezifische Immuntherapie (ASI)

Die ASI beruht auf der von Paul Ehrlich aufgestellten und von Macfarlane Burnet ausgebauten Theorie (Schubert 2000) der Immunüberwachung, nach der die Immunreaktion des Patienten gegen seinen Tumor durch modifizierte autologe oder allogene Tumorzellen verändert wird. Zunächst erfolgversprechende Ergebnisse von Tallberg (Tallberg et al. 1985) konnten in nachfolgenden Studien nicht oder nur teilweise reproduziert werden.

Neue Ansätze bildet der Einsatz dendritischer Zellen zur Vakzinierung, durch die die Aktivierung zytotoxischer Zellen optimiert werden soll. Erste Untersuchungen ergaben Ansprechraten von bis zu 41% (Kugler et al. 2000), weitere Untersuchungen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen.

Hormontherapie

Da in Therapieversuchen mit Hormonen beim metastasierten Nierenzellkarzinom Remissionsraten von nicht mehr als 5% (Harris 1983) erreicht werden konnten, wurde auch dieser Ansatzpunkt wieder verworfen.

Strahlentherapie

Nierenzellkarzinome gelten als wenig strahlensensible Tumoren (Huguenin et al. 1998). Deshalb hat die Strahlentherapie palliativen Charakter und wird vor allem zur Schmerzreduktion bei Knochen- und Weichteilmetastasen eingesetzt. Hierbei sollen Tumoranteile inaktiviert werden, Knochenmetastasen können sich zurückbilden und rekalkifizieren.

Tumorembolisation

Bei symptomatischen metastasierenden Tumoren stellt diese Methode eine Alternative zur Operation dar, hat allerdings keinen Einfluss auf Tumorremission und Überlebenszeit.

Faktoren, die das Ansprechen der Nierenzellkarzinome auf biologische und chemische Faktoren beeinflussen

Um zu verstehen, warum die bisher verwendeten, beschriebenen Therapieoptionen meist ineffektiv sind, soll im Weiteren auf die involvierten biologischen Mechanismen eingegangen werden.

Kommentar [MSOffice1]: Das ist denke ch unverständlich, gehe ja nicht auf alle Therapieoptionen ein

Wirkungsmechanismen der eingesetzten Zytostatika

5-Fluorouracil

5-Fluorouracil gehört zur Gruppe der Antimetaboliten und ist chemisch gesehen ein fluoriertes Pyrimidinderivat. Intrazellulär werden zytotoxisch wirkende Metaboliten gebildet. Die Wirkung wird durch zwei Mechanismen erklärt:

Durch Hemmung des Enzyms Thymidylatsynthase, welches die Bildung des essentiellen DNS-Bausteines Thymidin katalysiert, kommt es zur Verarmung der Zelle an Thymidin und damit zum Zelltod.

Als weiterer, wahrscheinlich untergeordneter Mechanismus kann 5-Fluorouracil in Form eines Metaboliten in die RNS eingebaut werden, was durch fehlerhaft strukturierte RNS zur Synthese falscher Proteine führen kann.

Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Anthracyclin mit komplexen Wirkungsmechanismen. Durch Anlagerung an komplementäre Basenpaare des Doppelstranges wird der DNS-Polymerase der Zugang verwehrt und damit eine erhöhte Stabilität der Doppelhelix erreicht. Daraus resultieren verminderte DNS- und RNS-Syntheseraten. Durch Bildung toxischer Intermediärprodukte kommt es unter anderem zu Doppelstrangbrüchen der DNS. Außerdem wirkt Doxorubicin auch an Membranen, eventuell durch Bindung an Phospholipide.

Caelyx (Doxorubicin-HCl)

Caelyx ist eine polyethylenglykolisierte Liposomenzubereitung von Doxorubicin. Die Liposomen bewirken dabei einen gezielteren Transport in das Tumorgewebe und können die kardiotoxischen Plasmaspitzenkonzentrationen des herkömmlichen Doxorubicins vermindern. Klinisch resultiert eine bessere Verträglichkeit.

Gemcitabin (2',2'-Difluorodeoxycytidine)

Auch Gemcitabin zählt zu den Antimetaboliten und wird intrazellulär zu den wirksamen Metaboliten Di- und Triphosphat-Nukleosid umgewandelt. Zum einen wird die Bildung der Deoxynukleosidtriphosphate für die DNS-Synthese blockiert. Zum anderen werden ein Gemcitabin-Metabolit, und in geringem Maße auch Gemcitabin selbst, in die DNS eingebaut, wobei die fehlerhaften Stränge kaum durch die DNS-Polymerase repariert werden können. Nach Einbau in die DNS scheint Gemcitabin-Triphosphat einen programmierten Zelltod einzuleiten.

Apoptosemechanismen

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod einer Zelle bezeichnet. Durch kaskadenartige Aktivierung von Proteasen des Zytoplasmas werden Stoffwechsellenzyme, das Zytoskelett und schließlich die DNS zerstört. Morphologisch kommt es dabei zur Kondensation des Chromatins und zur Abrundung und Ablösung adhärenter Zellen und im Verlauf zur Fragmentierung des Zellkerns und später der ganzen Zelle, wobei die Integrität der Membran erhalten bleibt. Apoptotische Zellen werden durch Änderung in der Plasmamembran rasch phagozytiert ohne dass Zellbestandteile freigesetzt werden.

0 Einleitung

Man unterscheidet mindestens zwei verschiedene Apoptosemechanismen: die „Derepressionsapoptose“ durch Entzug von Wachstumsfaktoren bzw. die „Aktivierungsapoptose“, ausgelöst durch TNF- α und seine Verwandten.

Derepressionsapoptose

Die vielfache Kontrolle der Proliferation von Zellen eines Organismus spielt eine große Rolle für das Überleben des Gesamtorganismus. Eine Kontrollinstanz ist der Stop des Zellzyklus durch den Wegfall eines Proliferationsreizes. Eine andere, weitaus wichtigere Ebene der Kontrolle ist die aktive Intervention zum einen bei physiologischen Prozessen zur Bereitstellung einer ausreichenden Zellzahl in sich verschleißenden Geweben oder nach Beendigung von Reparaturprozessen, zum anderen bei pathologischen Zuständen. Bei Schädigung der DNS, z.B. Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung, kommt es zu einer gesteigerten Synthese von Proteinen, die den Zellzyklus in Richtung G₀-Phase verschieben. Dadurch werden die Proliferations- aber auch die Apoptosebereitschaft herunterreguliert, so dass eine Reparatur der Zelle möglich wird und sie gegebenenfalls überleben kann. Sind die Reparaturmechanismen nicht erfolgreich bzw. ist die Proliferation nicht zu stoppen, sorgen Kontrollmechanismen für eine Elimination der Zelle durch Apoptose.

Aktivierungsapoptose

Diese Form der Apoptose ist unabhängig vom Proliferationszustand der Zellen. Sie wird durch Zytokine der TNF-Familie ausgelöst. Nach Bindung von trimerem TNF an den TNF-Rezeptor I wird eine Signalkette in Gang gesetzt, an deren Ende unter anderem die Aktivierung von NF- κ B steht, welches antiapoptotische Wirkungen hat. Wird die Wirkung von NF- κ B blockiert, kommt die Apoptose zum Tragen. Bei Aktivierung von Faktoren, die NF- κ B nicht aktivieren, wird unter Umständen unmittelbar der programmierte Zelltod ausgelöst.

Diese Mechanismen werden z.B. bei einer Blockade der Proteinsynthese oder der RNS-Synthese wirksam.

Nuclear factor –kappa B (NF-κB)

NF-κB ist ein allgegenwärtiger Transkriptionsfaktor, der eine große Rolle in der Zytokin-induzierten Genaktivierung spielt. Zu seinen Charakteristika zählen die schnelle posttranslationale Aktivierung als Antwort auf viele pathogene Signale, besonders wichtig bei immunologischen Reaktionen, sein direktes Mitwirken bei der cytoplasmatisch-nukleären „Kommunikation“ und die Fähigkeit, die Transkription einer Reihe immunologisch relevanter Proteine zu aktivieren.

Die NF-κB-Aktivität spielt eine Rolle beim toxischen und septischen Schock, bei Graft-versus-host-Reaktionen, akuten Entzündungsreaktionen, bei Akute-Phase-Reaktionen (Duyao et al. 1990) sowie bei Strahlenschäden.

Außerdem führt aktiviertes NF-κB über die Induktion verschiedener Zytokine zu einer Unterbrechung apoptotischer Signale und hemmt so die Apoptose von Zellen. Dies stellt einen möglichen Ansatzpunkt in der Verbesserung der Effektivität in der Tumorthherapie dar.

Aufbau, Eigenschaften und Funktion des NF-κB

Die Bezeichnung NF-κB umfasst mindestens fünf verschiedene DNS- bindende Proteine. Zu ihnen zählen *NFκB1*, *NFκB2*, *RelA*, *RelB* und *Rel* (Liou und Baltimore 1993). Diese Monomere bilden eine Vielzahl dimerer Komplexe mit verschiedener transkriptionaler Aktivität, DNA-Sequenz-Spezifität und Expression (Baeuerle und Henkel 1994). Das Heterodimer p50/p65 ist das am häufigsten Vorkommende (Fan und Maniatis 1991, Baeuerle und Henkel 1994). Die DNS-Bindung wird über meist palindrome DNS-Sequenzen erreicht (Konsensussequenz: GGGPuNNPyPyCC (Grimm und Baeuerle 1993) oder GGGPuNNPyCC).

Die Komplexe werden im Ruhezustand der Zelle durch sogenannte Inaktivatoren des NF-κB (IκB) im Zytoplasma gehalten (Beg et al. 1992, Henkel et al. 1992, Ganchi et al. 1992, Zabel et al. 1993), indem sie das NLS (nuclear localization signal) maskieren. Weiterhin verhindert IκB die DNA-Bindung von NF-κB (Baeuerle und Baltimore 1988, Beg und Baldwin 1993). Bisher sind sechs verschiedene IκB-Proteine bekannt (IκB-α, IκB-β, IκB-γ, p105, p100, Bcl3), wobei IκB-α das bisher am besten charakterisierte ist. P105 und p100 sind sowohl IκB's (Rice et al. 1992, Mercurio et al. 1993, Naumann et al. 1993) als auch Vorläufer von p52 bzw. p50 (Rice et al. 1992, Mercurio et al. 1993, Naumann et al. 1993,

0 Einleitung

Scheinmann et al. 1993), welche durch proteolytische Spaltung und folgende Degradierung des inhibierenden Anteils entstehen.

Bei der Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch einen mehrstufig verlaufenden Prozess die Phosphorylierung des I κ B durch eine oder eventuell mehrere I κ B-Kinase(n). Je nach abgelaufener Phosphorylierung wird I κ B vom NF- κ B dissoziiert (Tyrosin-Phosphorylierung) (Imbert et al. 1996) oder zusätzlich in den Proteasomen abgebaut (Serin-Phosphorylierung) (Traenckner et al. 1995). Dadurch wird das NLS demaskiert. Dieses ermöglicht die Passage von Kernporen und somit den Transport von NF- κ B-Dimeren in den Zellkern (Ganchi et al. 1992, Zabel et al. 1993, Beg und Baldwin 1993), wo sie die Transkription zur Bildung verschiedener Proteine aktivieren. Eine Ausnahme bildet hierbei das p50/p50-Dimer, welches zwar über eine DNS-Bindungsstelle, jedoch keine Transaktivierungsdomäne verfügt. In diesem Zusammenhang wird eine transkriptionsfördernde Wirkung des I κ B-Proteins Bcl3 diskutiert (Bauerle und Henkel 1994), welches durch Bindung an ein p50/p50-Homodimer dieses inaktiviert und aus seiner DNS-Bindung löst und damit die Bindung transkriptionsfördernder Dimere ermöglicht (Franzoso et al. 1992, Nolan et al. 1993).

Die Regulation der NF- κ B-Aktivität wird durch Abbildung 1 veranschaulicht.

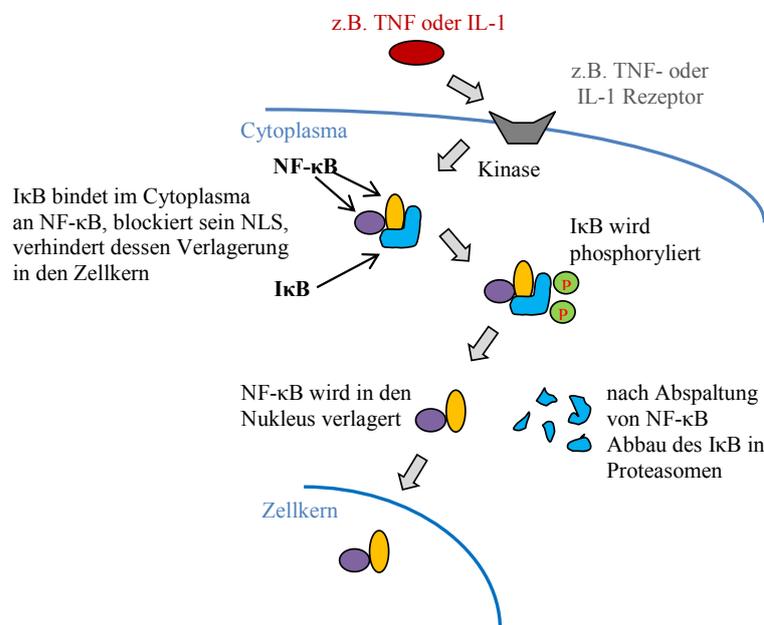


Abb. 1: Die Regulation der NF- κ B-Aktivität nach Perkins (Perkins et al. 1992)

0 Einleitung

Auffällig ist, dass alle NF- κ B-Gene auch über DNA-Bindungsstellen für diesen Faktor verfügen. Dadurch ist NF- κ B in der Lage, nach erfolgter Stimulation seine eigene Synthese zu fördern (Perkins et al. 1992). Außerdem werden auch IL-1 und TNF- α , zwei starke Aktivatoren des NF- κ B (Mathias et al. 1991, Dobrowsky und Hannun 1992) durch NF- κ B-Aktivität induziert (Mercurio et al. 1992). Weiterhin konnten auch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und Phorbolster (PMA) (Bours et al. 1990, Meyer et al. 1991, Ten et al. 1992) sowie die Serinprotease Thrombin als Stimuli des NF- κ B nachgewiesen werden.

Die Inaktivierung von NF- κ B erfolgt einerseits direkt durch den Zerfall des Transkriptionsfaktors, andererseits über eine Inaktivierung durch Anlagerung von neu gebildetem, im Zellkern befindlichem I κ B (Zabel et al. 1993).

Die Aktivierung von I κ B-Genen (Expression von I κ B) wird durch NF- κ B-aktivierende Stimuli stark erhöht, auf diese Weise reguliert NF- κ B selbst die Transkription seines Inhibitors (Brown et al. 1993, Scott et al. 1993, Sun et al. 1993). Eine erhöhte Bildung von p65, nicht aber von p50 erhöht die mRNA-Bildung von I κ B- α (Scott et al. 1993, Sun et al. 1993).

Es besteht also eine wechselseitige Regulation des Transkriptionsaktivators und seines Inhibitors auf transkriptionaler und posttranslationaler Ebene.

NF- κ B- induzierte Gene und deren Wirkung

NF- κ B ist verantwortlich für die Aktivierung einer Vielzahl von Genen. Dazu zählen verschiedene Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- α und deren Rezeptoren, Immunglobuline, MHC-Antigene und Viren (Zabel und Baeuerle 1990), aber auch Onkogene wie c-myc und c-fos. NF- κ B hat einerseits eine hemmende Funktion auf Apoptosemechanismen, kann allerdings auch Apoptose induzieren. Auch bei Proliferationsmechanismen kann der Transkriptionsfaktor sowohl fördernde (Baeuerle und Henkel 1994) als auch hemmende Wirkungen (Leonardo et al. 1989) haben. In den Tumor umgebenden Fibroblasten fördert die NF- κ B-Aktivierung über die Expression von Angiogenesefaktoren und Matrixproteasen die Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten und beeinflusst so das Fortschreiten der Erkrankung. Durch die rasche Induktion der Produktion von Zytokinen in Makrophagen und Endothelzellen spielt NF- κ B eine wichtige Rolle bei der Entstehung akuter Entzündungsreaktionen, septischem Schock, bei Reaktionen auf Strahlenschäden und bei graft-versus-host-Reaktionen (Billiau und

0 Einleitung

Vanderkerckhove 1991). Diese Tatsache macht NF- κ B interessant als Angriffspunkt von Medikamenten. NF- κ B-Inhibitoren könnten so möglicherweise diese akuten Reaktionen verhindern bzw. vermindern.

Eine schematische Übersicht über die Aktivierungsvorgänge zeigt Abbildung 2.

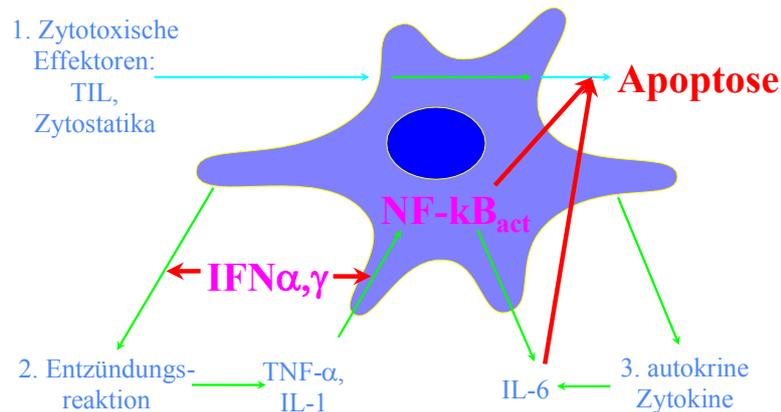


Abb. 2: Aktivierung von NF- κ B

Zytotoxische Effektoren (TIL - tumorinfiltrierende Lymphozyten, Zytostatika) führen zu Aktivierung von NF- κ B und diese zu einer Entzündungsreaktion. Dabei werden TNF- α und IL-1 aktiviert, die wiederum NF- κ B aktivieren. Dies führt zur Freisetzung verschiedener Zytokine (u.a. IL-6), welche aktiv der Apoptose entgegenwirken. IFN- α und IFN- γ verhindern Entzündungsreaktionen und die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α und IL-1.

NF- κ B-Inhibitoren

Caffeic acid phenylethyl ester (CAPE)

CAPE, strukturell mit Flavonoiden verwandt, ist eine aktive Komponente des Honigbienenstocks und gilt als potenter und spezifischer Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung. Es hat antivirale, antientzündliche und immunmodulatorische Eigenschaften (Grunberger et al. 1988) und ist in der Lage, das Wachstum verschiedener Typen veränderter Zellen zu hemmen (Grunberger et al. 1988, Burke et al. 1995). In transformierten Zellen induziert CAPE Apoptose durch Veränderung des Redoxstatus (Chiao et al. 1995). Aus

0 Einleitung

verschiedenen Studien wurde berichtet, dass CAPE die Lipidperoxidation unterdrückt, die antioxidative Aktivität hervorhebt (Kimura et al. 1985) und die Ornithindecaboxylase, die Proteintyrosinkinase- (PTK) und die Lipooxygenaseaktivität hemmt (Rao et al. 1992). Außerdem ist CAPE in der Lage, die Phorbolster- induzierte H_2O_2 -Produktion und die Förderung der Entstehung von Tumoren zu hemmen (Bhimani et al. 1993). Obwohl die molekulare Grundlage der vielfältigen Wirkungen, welche CAPE zugesprochen werden, noch nicht bekannt ist, sind die meisten dieser Wirkungen auf die NF- κ B- Aktivität angewiesen.

Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC)

PDTC ist ein Antioxidans und gilt als relativ selektiver NF- κ B- Inhibitor. Schreck (Schreck et al. 1992) zeigten, dass PDTC die LPS-, TNF- α - und PMA- induzierte NF- κ B- Aktivierung hemmt, auf andere untersuchte Transkriptionsfaktoren allerdings keinen Einfluss hat. In Versuchen von Kawai (Kawai et al. 1995) suppressierte PDTC die IL-1 α -induzierte NF- κ B- Aktivierung. Liu (Liu et al. 1999) demonstrierten, dass die LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B durch einen Mechanismus, der die Abspaltung von I κ B verhindert, gehemmt wird. Andere Autoren zeigten, dass durch PDTC die Expression NF- κ B- abhängiger Gene in verschiedenen Zelltypen gehemmt wird.

BAY 11-7082 (BAY)

Diese Verbindung hemmt selektiv und irreversibel die durch TNF- α induzierte Phosphorylierung von I κ B- α (s. oben). Daraus resultiert eine erniedrigte Konzentration von aktivem NF- κ B und z.B. eine geringere Expression von endothelialen Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (Pierce et al. 1997).

Der eigentliche Angriffspunkt ist derzeit noch unbekannt.

Zytokine

TNF- α

Das durch aktivierte Makrophagen produzierte Zytokin TNF- α wurde primär nach seiner Fähigkeit, die Nekrose von Meth A Sarkomen in vivo und die selektive Zerstörung von veränderten und neoplastischen Zellen in vitro zu bewirken, benannt (Carswell et al. 1975).

0 Einleitung

In den darauf folgenden Jahren zeigte sich, dass TNF- α in großem Ausmaß an biologischen Aktivitäten beteiligt war; die meisten bezogen sich auf Entzündungsreaktionen und zelluläre Immunreaktionen (Old 2008). Die Fähigkeit, das Wachstum, die Differenzierung und Funktion von bisher allen erforschten Zelltypen beeinflussen zu können, beruht vor allem in seinen potenten genregulatorischen Möglichkeiten (Krönke et al. 1992), welche durch zwei verschiedene Membranrezeptoren getriggert werden. TNF induzierte Effekte sind unter anderem die G-Protein-gekoppelte Aktivierung von Phospholipase (Suffys et al. 1987), Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale (Schulze-Osthoff et al. 1992) und DNS-Schädigung (Dealtry et al. 1987).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Einwirkungen von TNF- α auf TNF-Rezeptor-tragende Zellen mindestens drei intrazelluläre Signalwege aktiviert (Liu et al. 1996). Über TNF-R1 wird einerseits über FADD Apoptose induziert, andererseits kann über RIP und TRAF2 NF- κ B aktiviert werden, was dem induzierten Zelltod effektiv entgegenwirkt (Beg und Baltimore 1996, Wang et al. 1996, Van Antwerp et al. 1996), so dass ohne zusätzlich einwirkende Faktoren der Gesamteffekt in der Regel gering ist. Die Auswirkungen der Aktivierung des dritten bekannten Signalweges (MEKK/JNK/AP-1) auf das Überleben der Zellen sind umstritten. Auch über TNFR2 werden über TRAF2 NF- κ B und JNK aktiviert, eine Apoptoseinduktion über FADD erfolgt nicht.

Manna et al. wiesen nach, dass die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α in humanen Jurkat-Zellen durch IFN- α unterdrückt wird (Manna et al. 2000). Dieser Mechanismus ist offenbar verantwortlich für die Unterdrückung proliferativer Potenz in manchen Tumoren (die Zellen des Burkitt-Lymphoms, welches aus B-Lymphozyten entsteht, sind auf aktiviertes NF- κ B zur Erhaltung der Zellen angewiesen) (Wu et al. 1996, Rath und Aggarwal 2001).

IFN- α

IFN- α ist ein Zytokin, welches von Makrophagen als Antwort auf virale Infekte produziert wird.

Die Beeinflussung von NF- κ B durch Interferone wird kontrovers diskutiert. Yang (Yang et al. 1999) beschrieben in ihrem in vitro Model einen Interferon-Signalweg, welcher im Schutz der Zellen vor einer Reihe proapoptotischer Substanzen durch NF- κ B-Aktivierung resultiert. Sie schlossen daraus, dass der begrenzte klinische Effekt von IFN- α in der

0 Einleitung

Behandlung von Tumoren und viralen Infekten möglicherweise durch eine Induktion antiapoptotischer Signale durch einen NF- κ B-abhängigen Weg zu erklären ist.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Gribaudo et al. (Gribaudo et al. 1995), die zeigten, dass IFN- α die Expression muriner Immediate-early Gene durch Senkung der NF- κ B-Aktivität hemmt und damit dem Überleben der Zellen entgegenwirkt. Ein analoger Mechanismus wurde durch Oliveira (Oliveira et al. 1994) veröffentlicht, welcher demonstrierte, dass IFN- β die TNF- α -induzierte Expression NF- κ B-aktivierter Gene in humanen Fibroblasten hemmen kann.

3 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit einer Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität auf das Wachstum von Nierenzellkarzinomzellkulturen untersucht werden. Von Interesse war auch, ob durch Veränderung der NF- κ B-Aktivität eine Durchbrechung der Resistenz gegenüber Zytostatika möglich ist.

Dazu wurden unterschiedliche primäre Nierenzellkarzinomkulturen untersucht. Auf Grund der postulierten Heterogenität des Nierenzellkarzinoms haben wir Kulturen sowohl aus zentralen als auch peripheren Arealen in unsere Untersuchungen einbezogen und als verschiedene Tumore getrennt voneinander betrachtet.

Dabei erfassten wir die Wirkungen verschiedener potentieller NF- κ B-Inhibitoren, Zytostatika und Zytokine und auf die Tumorzellen sowohl in Monotherapie als auch in Kombination der Effektoren in unterschiedlichen Konzentrationen.

Nach diesem Prinzip wurden auch die permanenten Tumorzelllinien A498 (Nierenzellkarzinom) und HT29 (Kolonkarzinom) mit NF- κ B-Inhibitoren, Zytostatika und den Zytokinen IFN- α und TNF- α behandelt.

Außerdem wurde analysiert, ob eine Modulation der NF- κ B-Aktivität mittels Transfektion von aktiven bzw. inaktivierenden NF- κ B-Peptiden das Ansprechen auf die viele Jahre favorisierte Immunchemotherapie (IL-2, IFN- α und Zytostatika) beeinflussen kann.

Material und Methoden

Aufbereitung der Zellkulturen

Kultur permanenter Zelllinien

HT-29

HT-29 ist eine etablierte, permanente Kolonkarzinom-Zelllinie, welche in RPMI/FKS (s. Kapitel 4.4. Liste der Lösungen) bis zu Konfluenzraten von 100% kultiviert wurden.

A498

Die permanente humane Nierenzellkarzinom-Zelllinie wurde ebenfalls in RPMI/FKS (s. Kapitel 4.4. Liste der Lösungen) kultiviert und vor allem zum Vergleich mit primären Nierenzellkarzinomkulturen herangezogen.

Kultivierung von primären Nierenzellkarzinomen

Die Primärkulturen von Nierenzellkarzinomen wurden in der Klinik für Urologie aus bei der Operation entnommenen Gewebestücken angelegt. Dazu wurden diese mit Trypsin/Kollagenase angedaut und die so isolierten Tumorzellen in AmnioMax-100 Medium (Gibco Life Technologies) im Brutschrank bei 37°C, 5%CO₂ kultiviert.

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den kultivierten Zellen um Nierenkarzinomzellen und nicht etwa um Fibroblasten handelt, wurde vor Beginn der eigentlichen Versuche ein immunzytochemischer Test zum Nachweis von Zytokeratinen durchgeführt. Zytokeratin ist ein Zytoskelett-Antigen, welches praktisch ausschließlich von epithelialen Zellen exprimiert wird. Hierbei wurden Zellen der zu testenden Zelllinie in 96-Kavitäten-Flachbodenplatten kultiviert. Als Antikörper wurde RTU-PAN-CK (NOVO CASTRA), ein monoklonaler Maus-Antikörper und ein mit Alkalischer Phosphatase konjugiertes Ziege-anti-Maus-Serum (G a M AP) verwendet; zur Färbung wurde BCIP/NBT (s. Kapitel 4.4. Liste der Lösungen) eingesetzt. Die Zellen wurden mikroskopisch beurteilt.

Aufbewahrung der Kulturen

Während der Inkubationszeiten aller Versuche wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ aufbewahrt.

Stimulationsexperimente mit NF-κB-Inhibitoren, Zytostatika und Zytokinen

Vorbereiten der Zellen für die Stimulation

Zur Transfektion wurden die Zellen wie folgt aufgearbeitet: Die adhärennten Zellen wurden von den Kulturflaschen (25cm²) (Greiner, Deutschland) durch Trypsinieren gelöst: Nach Entfernen des Mediums wurde mit PBS 1x gespült und danach 1ml Trypsin/EDTA 1x (Sigma) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 3-5 min, wenn die Zellen abgelöst waren, wurde die Proteolyse mit FKS-haltigem Medium beendet. Anschließend wurden die Zellen in Spitzbodenreagenzgläsern zentrifugiert (803xg für 5min) und resuspendiert.

Aufgenommen wurden die Zellen in 96-Kavitäten-Flachbodenplatten in je 100µl Nährmedium mit 3000-4000 Zellen pro well (um eine Konfluenz von 50-80% zu erreichen). Während der Anwachzeit wurden die Zellen maximal zwei Tage im Brutschrank aufbewahrt, um eine gleichmäßige Zelldichte zu bewahren.

Stimulation mit NF-κB-Inhibitoren, Zytostatika und Zytokinen

Nun wurden die verschiedenen NF-κB Inhibitoren (s. Kapitel 4.4. Liste der Lösungen) sowie das Zytokin IFN-α in folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

IFN-α	Ic ₁ = 10ng/ml Ic ₂ = 40ng/ml
BAY	Bc ₁ = 5µM Bc ₂ = 20µM
CAPE	Cc ₁ = 20µM Cc ₂ = 80µM
PDTC	Pc ₁ = 50µM Pc ₂ = 250µM

In einer Studie (Pierce et al. 1997) lag der untersuchte effektive Wirkungsbereich von BAY zwischen 5 und 20µM.

0 Material und Methoden

CAPE wurde von Michaluart (Michaluart et al. 1999) in Konzentrationen von 9-71 μ M und von Natarajan (Natarajan et al. 1996) mit bis zu 90 μ M eingesetzt.

PDTC wurde von Sherman (Sherman et al. 1993) erfolgreich in einem Bereich von 25-50 μ M, sowie von Ziegler-Heitbrock (Ziegler-Heitbrock et al. 1993) mit 300 μ M getestet.

Die mit den Inhibitoren versetzten Zellen wurden für 12 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die verschiedenen zytotoxischen Effektoren hinzu gegeben. Während der Versuchsreihe wurden einige Male die Versuchsanordnung und die verschiedenen Verdünnungsstufen insbesondere der Zytostatika geändert, was den im Laufe der Zeit gewonnenen Erfahrungen einerseits, andererseits den unterschiedlichen verfügbaren Zellzahlen geschuldet war. Die Effektoren wurden wie folgt eingesetzt und für 24 Stunden inkubiert:

Tabelle 6 : Konzentration der eingesetzten Zytostatika und TNF- α

Effektor	Eingesetzte Endkonzentration
Doxorubicin	Dc ₁ = 2,9 μ g/ml Dc ₂ = 11,6 μ g/ml Dc ₃ = 46,4 μ g/ml
5-Fluorouracil	Fc ₁ = 0,65 μ g/ml Fc ₂ = 2,6 μ g/ml Fc ₃ = 10,4 μ g/ml
Gemcitabin	Gc ₁ = 0,1 μ g/ml Gc ₂ = 0,4 μ g/ml Gc ₃ = 1,6 μ g/ml
TNF- α	Tc ₁ = 2,5 ng/ml Tc ₂ = 10 ng/ml Tc ₃ = 40 ng/ml

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden der XTT Cell Proliferation Kit II (Boehringer Mannheim) und Kristallviolett als Messmethoden zur Bestimmung der Zelldichte angewandt.

0 Material und Methoden

Stoffwechselumsatzmessung mittels XTT

Der XTT-Assay basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliums Salzes XTT durch Dehydrogenaseaktivität an verschiedenen Lokalisationen in den Zellen, bei welcher die Formazan-Form entsteht. Der Dehydrogenasegehalt der Probe korreliert direkt mit der Menge der orangefarbenen Formazanform (umgesetztes XTT), gemessen durch die Absorption bei 450nm (Referenzfilter 620nm).

Das Assay wurde nach Anweisungen des Herstellers mit folgenden Modifikationen ausgeführt:

Zur Korrektur subtrahierten wir die zu Anfang gemessene Extinktion (hervorgerufen durch die Zellen selbst und die rote Färbung durch Doxorubicin) als Basiswert von der Extinktion nach Inkubation mit dem XTT. Die Inkubationszeit schwankte zwischen 2-4 Stunden, je nach Geschwindigkeit der Farbreaktion. Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Durchmischung wurden die Kulturen wiederholt geschüttelt.

Proteinmengenbestimmung mittels Kristallviolett

Kristallviolett besitzt eine hohe Affinität zu Eiweißen, die hier für die Bestimmung der Eiweißmenge als Maß der Zellzahl in den Kulturen wie folgt genutzt wurde:

Das Medium wurde aus der 96-Kavitäten-Flachbodenplatte über dem Waschbecken abgeschüttet und gründlich auf Papiertüchern ausgeschlagen, um möglichst alles restliche Medium zu entfernen.

Es erfolgten zwei Waschungen mit PBS 1x, bei denen die Platte komplett geflutet und danach wieder abgeschlagen wurde.

Methanol wurde mit 100µl pro Well zum Fixieren in die Kavitäten pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Methanol wurde gründlich ausgeschüttet und abgeschlagen und die Platten wenige Minuten zum Trocknen stehen gelassen.

Es wurden pro Well 50µl 0,1% Kristallviolett in PBS 1x in die Kavitäten pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass der Boden vollständig mit Farblösung bedeckt war. Die Inkubationszeit betrug wiederum 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Farbe wurde abgeschlagen und es erfolgten zwei Spülungen mit Aqua dest. mit nachfolgender vollständiger Flutung der Platten.

Zum Schluss wurden die fixierten und gefärbten Zellen in je 100µl 0,5% SDS in Aqua dest. auf dem Plattenschüttler lysiert.

0 Material und Methoden

Innerhalb von 5-10 Minuten musste die Extinktionsmessung bei 570 vs. 405nm erfolgen. Nach dieser Zeit erfolgt ein Ausbleichen der Farbe, das eine effektive Messung unmöglich macht.

Transfektionsexperimente

Vorbereiten der Zellen für die Transfektion

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben von der Kulturflasche geerntet und in 12-Kavitätenplatten (Greiner, Deutschland) in je 1ml Nährmedium (A/R/R, siehe Kapitel 4.4. Liste der Lösungen) mit 50.000 Zellen pro well aufgenommen. Zum Anwachsen wurden die Platten im Brutschrank aufbewahrt. 24 Stunden später wurde die Transfektion durchgeführt.

Transfektion

Drei bis vier Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen mit 750µl eines nicht FKS-haltigen Mediums (OPTI-MEM 1, Gibco) versehen.

Zur Transfektion wurde FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim), eine Mischung von Lipiden und anderen Inhaltsstoffen in 80% Ethanol, nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

Bei Testtransfektionen wurde für die 12-Kavitätenplatte (ca. 50.000 Zellen in 750µl Medium) ein Optimum von 2µl FuGENE 6 Reagent und 1,3µg DNS bestimmt. Die DNS wurde in einem Verhältnis von 33% Plasmid pGreen Lantern™ -1 (Life Technologies) und 66% Plasmid pCMVINp65 (Rice et al. 1992) oder Plasmid pPMECMVIκB (Rice et al. 1992) zugegeben.

Die Inkubation erfolgte für mindestens 12 Stunden im Brutschrank.

Beschreibung der genutzten Vektoren

PGL1 = zur Expression in Säugerzellen optimierte Mutante des Green Fluorescent Protein (GFP) unter Kontrolle eines hocheffektiven CMV-Ie-Promoters. Es wurde als Positivkontrolle der Transfektionen zur Abschätzung der Transfektionseffizienz genutzt.

pPMECMVIκB = dominant negatives IκB (durch mutierte Phosphorylierungsstellen ist keine Phosphorylierung möglich und damit keine Degradation des IκB und keine

0 Material und Methoden

Aktivierung von NF- κ B) unter Kontrolle eines hocheffektiven CMV-Promoters. Dies wurde zur Blockade von NF- κ B-Aktivierung genutzt.

pCMVINp65 = konstitutiv aktive Form von p65 unter Kontrolle eines hocheffektiven CMV-Promoters. Durch eine Mutation der Bindungsstelle für I κ B ist keine Inhibition möglich, alles synthetisierte NF- κ B-p65 wird sofort in den Kern transportiert. Wir verwendeten dies zur Auslösung eines permanenten, starken NF- κ B-Signals.

Stimulation mit IL-2, IFN- α und Zytostatika pCMVINp65- und pPMECMVI κ B transfizierter Zellen

20-24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen erneut trypsiniert (Vorgang wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben), gepoolt und zentrifugiert.

Nach gründlichem Resuspendieren trugen wir die Zellen auf runden Deckgläschen auf, welche steril in 24-Kavitätenplatten in je 500 μ l Nährmedium (A/R/R) (s. Kapitel 4.4. Liste der Lösungen) gebracht wurden.

Ca. 24 Stunden später begannen wir mit der Stimulation mit IL-2 (10ng/ml) und nach 24 Stunden wurde IFN- α (10ng/ml) in den Endkonzentrationen

IL-2 ILC₁ = 10 ng/ml

IFN- α Ic₁ = 10 ng/ml zugesetzt.

Wiederum 24 Stunden später wurden die Zytostatika, in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt, zugegeben:

Caelyx CAc₁ = 0,2 μ g/ml

Gemcitabin Gc₁ = 0,1 μ g/ml

5-Fluorouracil Fc₁ = 0,65 μ g/ml

Doxorubicin Dc₁ = 2,9 μ g/ml

Die genutzten Konzentrationen der Zytostatika entsprechen den für das Innere von Tumoren berichteten. Weitere 24 Stunden später wurden die Deckgläschen in PFA/PBS/Hoechst 33342 fixiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (s. Kapitel 4.3.6 Mikroskopische Auswertung).

Außerdem führten wir bei jedem Test mindestens eine Kontrolle mit.

0 Material und Methoden

Fixieren der Zellen mit PFA und Hoechst

Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen war, wurden die Deckgläschen zweimal mit je 500µl PBS 1x pro well gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0,5% Paraformaldehyd in PBS 1x zu je 250µl für 15 min bei Raumtemperatur. In dieser Lösung war zusätzlich der DNS-Farbstoff Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.) mit einer Konzentration von 0,5µg/ml enthalten, weshalb die Inkubation im Dunkeln erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Fixationslösung vorsichtig von den Zellen abgesaugt. Diese wurden mit 500µl PBS 1x gewaschen, das PBS wurde wieder abgesaugt und es wurden nochmals 1000µl PBS 1x auf die Zellen gegeben, damit diese während ihrer Aufbewahrung für maximal 4 Wochen im Kühlschrank bis zur Auswertung nicht austrockneten. Innerhalb dieses Zeitraumes wurde kein Nachlassen der Fluoreszenz festgestellt.

Mikroskopische Auswertung

In der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden zuerst die bei Blauanregung (Wellenlänge 490-510nm) durch das transfizierte Plasmid pGL1 grün leuchtenden Zellen gesucht, gezählt und morphologisch beurteilt (Abbildung 3a). Außerdem wurde der bei UV/Violettanregung (Wellenlänge <450nm) durch den DNA-Farbstoff Hoechst 33342 blau erscheinende Kern auf morphologische Besonderheiten und Anzeichen für eine eventuell abgelaufene bzw. ablaufende Apoptose hin untersucht (Abbildung 3b). Es sollten hier, so vorhanden, mindestens 100 in eine der folgenden Gruppen eingeteilten transfizierten Zellen beurteilt werden: GFP+ (Green Fluoreszent Protein positiv), GFP+/suspekt (morphologisch nicht gesunde transfizierte Zellen, die sich eventuell im Stadium der beginnenden Apoptose befinden) und GFP+/Apoptose (eindeutig apoptotische transfizierte Zellen). Danach wurden ca. 200 nicht transfizierte (d.h. die GFP negativen) Zellen nach gleichen Standards beurteilt. Bei gleichzeitig reduzierter Gesamtzellzahl kann ein entsprechender Effekt an den transfizierten Zellen nicht auf die transfizierten Plasmide zurückgeführt werden. Außerdem wurden auf die Zelldichte und auf sich zum Zeitpunkt der Fixation in Mitose befindliche Zellen geachtet, um den Grad der Proliferation beurteilen zu können. Weiterhin wurde grob die Transfektionseffizienz eingeschätzt.

0 Material und Methoden

Fehlende Werte entstanden unter anderem durch zu geringe Zelldichten auf den Deckgläschen, zu geringe Transfektionseffizienz und somit zu wenig beurteilbare Zellen, durch infolge von Scherwirkungen zerstörte Zellen und eingeschleppte Keime.

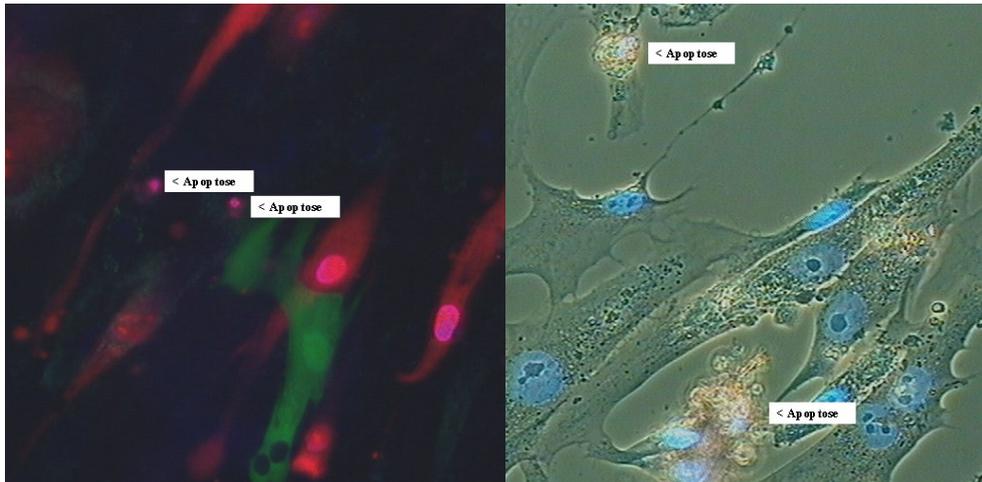


Abb. 3a und 3b: Beispiele der mikroskopischen Auswertung bei Blauanregung (3a) und Violettanregung (3b)

Liste verwendeter Lösungen

AmnioMax-100	Basismedium mit Supplement, Gibco Life Technologies
A/R/R	AmnioMax-100 RECG RPMI / FKS zu jeweils gleichen Teilen enthalten
BAY	BAY 11-7082, Alexis Biochemicals
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, Boehringer Mannheim
Caelyx	Doxorubicin-HCl (polyethylenglykolisiert), Caelyx™, N.V.SP, Labo Belgien
CAPE	Caffeic acid phenylethyl ester, Alexis Biochemicals
Doxorubicin	Doxorubicin, Pharmacia&Upjohn
EDTA	
FKS	fötales Kälberserum, 30 min inaktiviert bei 56°C, Greiner
5-Fluorouracil	5-Fluorouracil, biosyn Arzneimittel GmbH, Deutschland
FuGENE™6	Transfection Reagent Kit, Boehringer Mannheim
G aM AP	Ziege-anti-Maus-Serum (Goat anti Mouse Alkaline Phosphatase)
Gemcitabin	Gemcitabinhydrochlorid, Gemzar®, Lilly
Glutamax-I	Gibco Life Technologies
Hoechst 33342	Molecular Probes
IFN- α	Peprro Tech
IL-2	PBH
Kristallviolett	Sigma
Methanol	Roth, Karlsruhe
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NP40	Nonidet P-40, Sigma
Opti-MEM1	Gibco Life Technologies
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS/0,5%NP40	99,5% PBS 1x und 0,5% NP40, Sigma
PBS 10x	87,66 g NaCl 1,632 g KH ₂ PO ₄ 15,66 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O Wasser ad 1000 ml

4 Material und Methoden

PDTC	Pyrrolidinedithiocarbamic acid.ammonium salt, Alexis Biochemicals
PFA	Paraformaldehyd 1%, in PBS 1x, Sigma
PMS	N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate in PBS enthalten
im	XTT-Kit
RECG	Renal Epithelial Cell Growth Medium, PromoCell
RPMI in FKS 10%	90 ml RPMI 1640, SEROMED 10 ml FKS, Greiner 1 ml Glutamax-I 100x, Gibco Life Technologies 100µl β-Mercaptoethanol 1000x, Ferak Berlin 150µl Gentamycin 80%, Ratiopharm
RTU-PAN-CK	monoklonaler Maus-Antikörper (NOVO CASTRA)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Laurylsulfat, Sigma
TNF-α	Peppo Tech
Trypsin	Trypsin-EDTA (10x), Sigma
XTT	Tetrazolium salt, Cell Proliferation Kit II, Boehringer Mannheim

Ergebnisse

Stimulation der Zellkulturen mit NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika

Ziel dieser Versuche war, die Wirkung der einzelnen Substanzen allein auf die Zellen zu untersuchen und dann zu prüfen, ob Interaktionen zwischen den Bestandteilen einer Kombination der verschiedenen Substanzen zu finden sind.

Die Effekte wurden in folgende Reaktionstypen unterteilt:

- R Reduktion des Stoffwechselumsatzes, was auf eine Abnahme der Zellzahl schließen lässt und für einen zytotoxischen Effekt der eingesetzten Substanz spricht
- 0 kein Effekt im Vergleich zur Bezugsgröße
- P Zunahme des Stoffwechselumsatzes, was auf eine Proliferation der Zellen schließen lässt.

Es wurden zwei verschiedene Nachweismethoden eingesetzt, der XTT-Stoffwechselumsatz und eine Proteinmengenbestimmung mit Kristallviolett. Die Methoden erbrachten teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse, so dass diese getrennt voneinander betrachtet werden sollen.

Untersuchungen an permanenten HT 29 und A498 Zelllinien

HT29 im XTT-Stoffwechselumsatz

Die Wirkungen der verschiedenen NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika sowie TNF- α sind in Tabelle 7 dargestellt.

0 Ergebnisse

Tabelle 7: Effekt der Zytostatika bzw. potentiellen NF- κ B- Inhibitoren auf die Zellproliferation von HT29-Zellen. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – XTT

	K Zyt.	IFN- α			BAY			CAPE		
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂
Dox	R(Dc ₃)	0	0	R	0	0	0	0	R	0
TNF- α	0	0	R	R	0	0	0	0	0	0
5-FU	0	0	R	R	0	0	0	0	0	0
Gem	0	0	R	R	0	0	0	0	0	0

Legende: 1.Zeile: eingesetzte potentielle NF- κ B- Inhibitoren; 1.Spalte: eingesetzte Zytostatika und TNF- α ; 2.Spalte: Einsatz von Zytostatika allein; Spalten „K Inh.“: Einsatz des jeweiligen potentiellen NF- κ B- Inhibitors allein; folgende zwei Spalten eines jeden Kastens: zusätzlicher Effekt der Inhibitoren (in den Konzentrationen c₁ und c₂) bezogen auf die alleinige Gabe des Zytostatikums; Konzentrationen c₁ und c₂ für Inhibitoren bzw. c₁-c₃ für Zytostatika siehe Kapitel 4.3.2.; R(c_{1,3}) bzw. P(c_{1,3}) stehen für eine Reduktion bzw. Proliferation der Zellzahlen unter dem entsprechenden Zytostatikum bzw. Inhibitor in der angegebenen Konzentration c₁-c₃

Bei den Zytostatika ist lediglich beim Einsatz von Doxorubicin in hoher Dosierung (Dc3) ein Effekt zu erkennen; TNF- α , 5-Fluorouracil und Gemcitabin scheinen keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen zu haben. Von den getesteten Inhibitoren zeigen BAY und CAPE keine Wirkung auf diese Zelllinie, wo hingegen der Einsatz von IFN- α zu einer Reduktion der Zellen führen kann, jedoch nur in Kombination mit einem Zytostatikum. Lediglich der Effekt des Doxorubicin ist durch IFN- α nicht zu verbessern. Verabreicht man IFN- α allein ist kein signifikanter Effekt auf die Zellen zu erzielen. Es lässt sich dementsprechend ableiten, dass IFN- α den Effekt der Zytostatika verstärkt außer in der Kombination mit Doxorubicin (da Doxorubicin allein eine starke Wirkung hat).

HT29 in der Kristallviolett-färbung

Die Wirkung der applizierten Substanzen stellt sich, wie Tabelle 8 zeigt, in der Kristallviolett-färbung deutlich heterogener dar.

0 Ergebnisse

Tabelle 8: Effekt der Zytostatika bzw. potentiellen NF- κ B- Inhibitoren auf die Zellproliferation von HT29-Zellen. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Kristallviolettfärbung

	K Zyt.	IFN- α			BAY			CAPE		
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂
Dox	0	R(Dc ₁)	0	R	0	0	0	R(Dc ₂)	0	R
TNF- α	0	P(Tc ₂)	P	P	P(Tc ₂)	0	P	0	0	P
5-FU	0	0	0	0	P(Fc ₁)	0	0	0	0	R
Gem	0	R(Gc ₁)	0	0	0	0	R	R(Gc ₂)	0	R

Legende: Darstellung analog Tabelle 7.

Bei keinem der untersuchten Zytostatika zeigte sich in der Monotherapie eine Wirkung. Nach Zugabe von IFN- α und CAPE konnte eine Zellreduktion gemessen werden. Die Zugabe von TNF- α führte bei zusätzlicher Behandlung mit den Inhibitoren zu einem proliferationsfördernden Effekt. Die Behandlung mit 5-Fluorouracil und Gemcitabin führt zu keiner signifikanten Veränderung. Die einzelnen zellreduzierenden Effekte sind hier am ehesten auf die Wirkung der entsprechenden Inhibitoren zurückzuführen und treten nur in hoher Konzentration des jeweiligen Inhibitors auf.

Vergleich von XTT und Kristallviolett

Im XTT- Nachweis zeigt lediglich die Gabe von Doxorubicin sowie die Kombination von 5-Fluorouracil, Gemcitabin und TNF- α mit IFN- α eine Wirkung im Sinne einer Zellreduktion.

Im Kristallviolettnachweis fallen die Ergebnisse deutlich heterogener aus. Hier scheinen lediglich die hochdosierten Gaben der Inhibitoren (c₂) zu einer Veränderung der Zelldichte zu führen. Bei TNF- α -Gabe äußert sich dies gar in einer Proliferationsneigung.

A498 im XTT- Stoffwechselumsatz

In der folgenden Tabelle (Tabelle 9) sind die Ergebnisse für die permanente Nierenzellkarzinom-Zelllinie A498 dargestellt.

0 Ergebnisse

Tabelle 9: Effekt der Zytostatika bzw. potentiellen NF- κ B- Inhibitoren auf die Zellproliferation von A498-Zellen. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - XTT

	K Zyt.	IFN- α			BAY			CAPE		
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂
Dox	R(Dc ₁)	0	R	R	0	0	R	0	0	0
TNF- α	0	0	0	0	R(Tc ₂)	0	R	R(Tc ₁)	R	0
5-FU	0	0	0	R	0	0	R	R(Fc ₂)	0	0
Gem	0	0	0	0	R(Gc ₂)	0	0	0	P	0

Legende: Darstellung analog Tabelle 7.

Unter der Behandlung mit Zytostatika allein trat nur nach Gabe von Doxorubicin eine Zellzahlreduktion auf. Die Wirkung konnte durch zusätzliche Gabe von IFN- α verbessert werden, wo hingegen die alleinige Gabe von IFN- α keinen Effekt zeigte. Auf die Wirkung der anderen Zytostatika hat IFN- α keinen Einfluss.

Unter Gabe des Inhibitors BAY in hoher Dosierung (Bc₂) kommt es zu einer Reduktion der Zellen.

Die Wirkungen von CAPE sind mit dieser Nachweismethode gering.

A498 in der Kristallviolettffärbung

Die Ergebnisse der Kristallviolettffärbung zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Effekt der Zytostatika bzw. potentiellen NF- κ B- Inhibitoren auf die Zellproliferation von A498-Zellen. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Kristallviolettffärbung

	K Zyt.	IFN- α			BAY			CAPE		
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂
Dox	R(Dc ₁)	R(Dc ₁)	R	R	R(Dc ₁)	R	R	R(Dc ₁)	0	0
TNF- α	0	0	0	R	R(Tc ₂)	0	R	R(Tc ₁)	R	R
5-FU	R(Fc ₃)	0	0	R	P(Fc ₁)	0	R	0	0	R
Gem	R(Gc ₁)	R(Gc ₁)	P	R	R(Gc ₂)	0	0	R(Gc ₂)	0	R

Legende: Darstellung analog Tabelle 7.

0 Ergebnisse

In der Proteinmengenbestimmung zeigen alle Zytostatika eine Wirkung im Sinne einer Zellzahlreduktion, dabei wirken Doxorubicin und Gemcitabin bereits in geringer Konzentration (Dc_1 , Gc_1), wo hingegen 5-Fluorouracil erst in hoher Konzentration (Fc_3) die Proteinmenge reduziert. Unter alleiniger Gabe von $TNF-\alpha$ ist kein Effekt nachweisbar.

Nach Zugabe von $IFN-\alpha$ in hoher Konzentration (Ic_2) ist in allen Fällen (Zytostatika + $TNF-\alpha$) ein zusätzlicher Effekt nachweisbar.

Auch BAY führt, in hoher Konzentration (Bc_2) verabreicht, zu einem zusätzlichen Effekt zu den Zytostatika, wirkt aber auch allein. Dies trifft ebenso auf CAPE zu.

Vergleich von XTT und Kristallviolett

Während im XTT-Test nur nach Behandlung der Zellen mit Doxorubicin eine Zellreduktion nachweisbar war, konnte dies im Kristallviolettnachweis für alle Zytostatika gezeigt werden. $TNF-\alpha$ hatte jedoch keinen Effekt. Außerdem wirkten sich im KV-Nachweis alle $NF-\kappa B$ -Inhibitoren zusätzlich in einer Reduktion der Zellzahl aus, insbesondere in höherer Konzentration; im XTT-Nachweis war dies nur für Doxorubicin und $IFN-\alpha$ zutreffend.

Untersuchungen an primären Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Es wurden bis zu 25 verschiedene Zelllinien mittels der Stoffwechselumsatzmessung XTT und 12 Zelllinien mittels Proteinnachweis durch Kristallviolett untersucht.

Effekte der Zytostatika

Zunächst prüften wir die Wirksamkeit verschiedener Zytostatika als Monotherapie auf die Zellproliferation der Zelllinien primärer Nierenzellkarzinome. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Nachweismethoden bestehen, wurde auf die Abbildung der Effekte in der Kristallviolett-Nachweismethode verzichtet.

Kommentar [MSOffice2]: Eventuell einfügen Überschrift „Effekte in den Monotherapien“

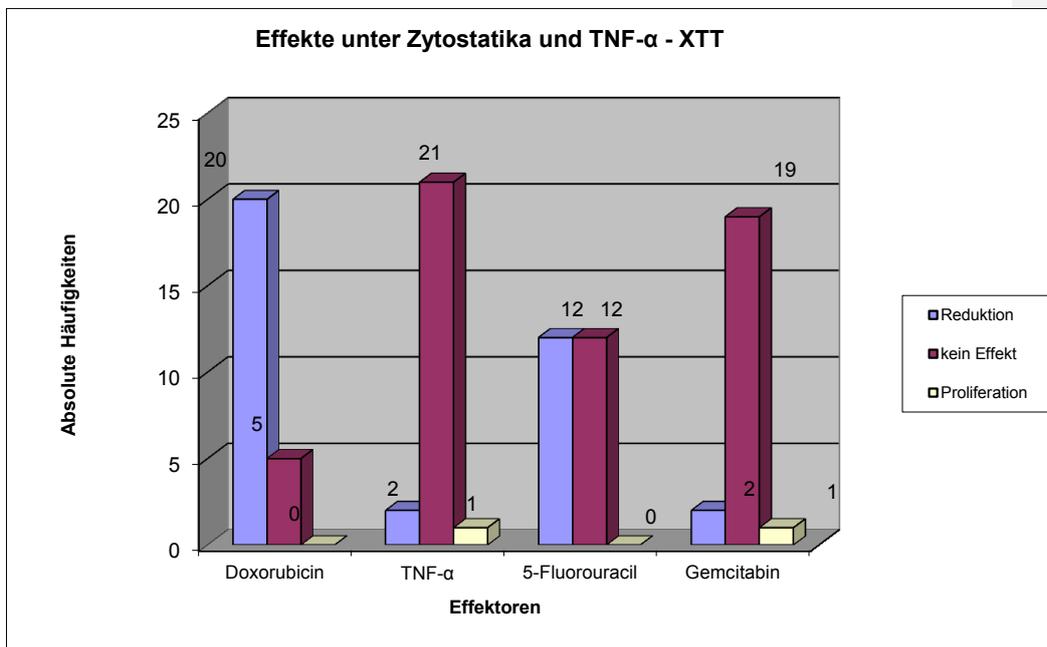


Abb.4: Effekte der Monotherapie mit Zytostatika auf die Zellproliferation – Absolute Häufigkeiten.

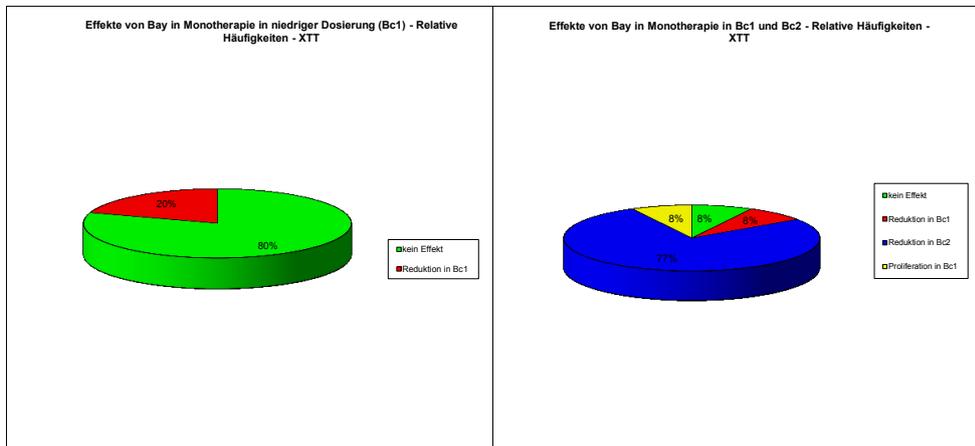
Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, hat die Gabe von Doxorubicin den größten Effekt auf die Zellproliferation im Sinne einer Reduktion der Zellen. Auch unter 5-Fluorouracil kann in der Hälfte der Fälle eine Reduktion der Zellzahlen nachgewiesen werden. Keinen nennenswerten Effekt in der Monotherapie zeigten Gemcitabin und TNF- α .

Effekte der NF- κ B- Inhibitoren

Auch die Inhibitoren wurden, wie zuvor schon für die Zytostatika gezeigt, als Einzelsubstanzen mit den verschiedenen Zelllinien inkubiert. Dabei wurde anfänglich lediglich jeweils eine Dosis des Inhibitors verwendet. In späteren Versuchen wurden zusätzlich höhere Konzentrationen jedes Inhibitors eingesetzt. Dies führte zu ganz unterschiedlichen Wirkungen. Außerdem fielen bei diesen Untersuchungen deutliche Unterschiede der Ergebnisse in den beiden durchgeführten Nachweismethoden auf. Aus diesem Grund sollen hier exemplarisch die Wirkungen der potentiellen NF- κ B- Inhibitoren BAY und CAPE für den XTT- Nachweis und die Kristallviolett- Färbemethode graphisch dargestellt werden.

0 Ergebnisse

Die Abbildungen 5a und 5b zeigen die Effekte des Inhibitors BAY in niedriger Konzentration (Bc_1) bzw. in beiden Konzentrationen (Bc_1 und Bc_2).



Kommentar [MSOffice3]: Hier komme ich auf 101%

Kommentar [MSOffice4]: Sollte man hier vielleicht lieber gegenüberstellen Diagramme der Wirkungen unter c_1 gegen c_2 ? So ist es irgendwie verwirrend. Stellt den Gesamteffekt dar (b), aber versteht der Leser, dass das bedeutet, dass mit hohen Dosen von Bay der Effekt erzielt wird?

Abb. 5a und 5b: Effekte der Monotherapie mit dem Inhibitor BAY auf die Zellproliferation im XTT-Nachweis – Relative Häufigkeiten

Wurde BAY nur in niedriger Konzentration (Bc_1) eingesetzt, konnte lediglich bei 20% der Versuche (2 Zelllinien) eine Reduktion der Zellzahlen nachgewiesen werden, wohingegen bei den übrigen 80% der Fälle (8 Zelllinien) kein Effekt nachzuweisen war.

Wurde allerdings zusätzlich die höhere Dosierung (Bc_2) eingesetzt, war in 77% der Fälle (10 Zelllinien) ein signifikanter Rückgang der Zellzahlen zu verzeichnen. Je 8% (je 1 Zelllinie) blieben (blieb) ohne Effekt, zeigte bereits eine Reduktion in Bc_1 bzw. eine Proliferation in Bc_1 , sodass insgesamt bei 85% der bearbeiteten Zelllinien mit der alleinigen Gabe von BAY eine signifikante Reduktion der Zellzahlen nachzuweisen war.

Setzte man bei den gleichen Zelllinien den potentiellen NF- κ B-Inhibitor CAPE ein, führte dies zu ganz anderen Ergebnissen. Diese sind im Folgenden in den Abbildungen 6a und 6b dargestellt.

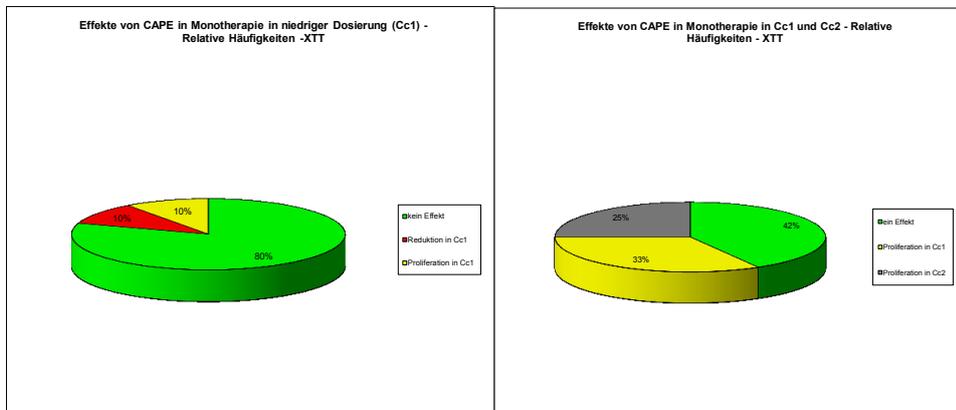


Abb. 6a und 6b: Effekte der Monotherapie mit dem Inhibitor CAPE auf die Zellproliferation im XTT-Nachweis – Relative Häufigkeiten

Ebenso wie bei der Gabe von BAY in niedriger Konzentration (C_{c1}) war auch mit der Behandlung mit CAPE bei 80% der Zelllinien kein Effekt nachweisbar (10 Zelllinien). Für jeweils 10% (je 1 Zelllinie) wurde entweder eine Proliferation oder eine Reduktion der Zellzahlen gezeigt.

Wurde CAPE jedoch zusätzlich in höherer Konzentration (C_{c2}) eingesetzt, war lediglich in 42% der Fälle (5 Zelllinien) kein Effekt mehr nachzuweisen. Bei einem Drittel der untersuchten Zelllinien kam es hier bereits in niedriger Konzentration (C_{c1}) zu einer Zellproliferation, bei weiteren 25% war in der C_{c2} -Konzentration ein proliferativer Effekt nachweisbar, d.h. es kam bei 58% der untersuchten Zelllinien unter der Zugabe von CAPE zu einer Zellproliferation.

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse für die Kristallviolett-Nachweismethode graphisch dargestellt, bei der alle Versuche mit je zwei Konzentrationen der Inhibitoren durchgeführt wurden.

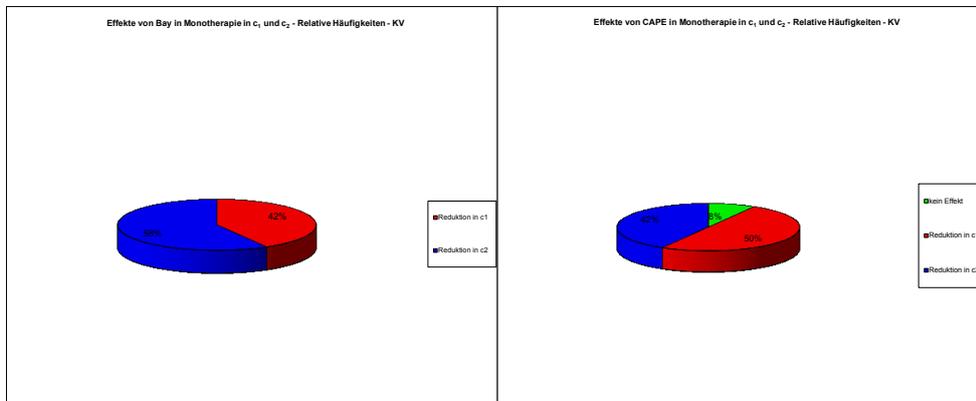


Abb. 7 und 8: Effekte der Monotherapie mit den Inhibitoren BAY bzw. CAPE auf die Zellproliferation in der Kristallviolett färbung (Test 11-23)

Führt man bei den mit BAY behandelten Zellen die Kristallviolett färbung durch, ist bereits bei 42% der Zelllinien eine Reduktion der Zellzahlen unter Zugabe von BAY in niedriger Konzentration (Bc_1) zu verzeichnen, bei 58% dann in der höheren Bc_2 -Konzentration; d.h. in allen Zelllinien wurde mittels Gabe von BAY eine Reduktion der Zellzahlen erreicht. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zum XTT- Stoffwechselumsatz dar.

Noch erheblicher werden die Unterschiede, wenn man die mit CAPE behandelten und Kristallviolett gefärbten Zellen betrachtet. Bei 8% ist kein Effekt nachweisbar. Bei 50% der Zelllinien zeigte sich dann jedoch eine Reduktion der Zellzahlen in der Cc_1 -Konzentration und bei 42% in der Cc_2 -Konzentration.

Es stellt sich nun die Frage, ob der Effekt der Zytostatika durch die Kombination mit anderen potentiell zelltoxischen Substanzen verbessert werden kann.

Ergebnisse der Kombination von Inhibitoren und Zytostatika

Die Versuche an den verschiedenen Zellkulturen wurden in mehrere Einzelversuche gegliedert. In einem Einzelversuch wurden ein Zytostatikum bzw. TNF- α und ein potentieller NF- κ B-Inhibitor sowie entsprechende Kombinationen der Einzelsubstanzen untersucht.

Nach Behandlung der Zellen mit den Effektoren erfolgte die Messung der Stoffwechselaktivität als indirekter Indikator für das Ausmaß an Zellproliferation durch Messung der Extinktion. Hierbei stehen ein hoher Extinktionswert für eine hohe Zellzahl und ein niedriger Extintionswert für eine geringe Zellzahl. Bei zu Beginn des Versuches

0 Ergebnisse

annähernd gleichen Ausgangszellzahlen ist die Ab- bzw. Zunahme der Extinktion ein Hinweis für Reduktion bzw. Proliferation der Zellen.

Kommentar [MSOffice5]: Material und Methoden?

Beispielhaft für einen Einzelversuch sind die entsprechenden Extinktionswerte in der folgenden Tabelle (Tab.11) sowie in Abbildung 9 dargestellt. Zum Ausschluss von Artefakten wurden Doppelversuche durchgeführt und die Extinktionen gemittelt.

Tabelle 11: Gemittelte Extinktionen unter Doxorubicin bzw. IFN- α und ihrer möglichen Kombinationen

		IFN- α		
		Konzentrationen	c ₀	Ic ₁
Doxorubicin	c ₀	1,017	1,139	0,787
	Dc ₁	0,425	0,114	0,133
	Dc ₂	0,509	0,166	0,118
	Dc ₃	0,205	0,139	0,107

Legende: eingesetzte Konzentrationen s. Kapitel 4.2.2

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wurde nach Gabe von Doxorubicin allein in allen drei eingesetzten Konzentrationen eine deutlich geringere Extinktion gemessen als in der Kontrolle. Für IFN- α trifft dies nur zu, wenn es in hoher Konzentration (Ic₂) verabreicht wurde. In niedriger Konzentration (Ic₁) ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachweisbar. Kombiniert man jedoch beide Substanzen kommt es bereits in der Kombination der niedrigsten Konzentrationen (Ic₁/Dc₁) zu einem weiteren Abfall des Extinktionswertes und damit zu einer Verminderung der Zellzahl (im Vergleich zur alleinigen Gabe von Doxorubicin). Höhere Dosierungen der Einzelsubstanzen in den Kombinationen verursachen jedoch keine weitere signifikante Senkung der Extinktionswerte.

Die farbig hervorgehobenen Werte zeigen die in Abbildung 9 dargestellten Extinktionen.

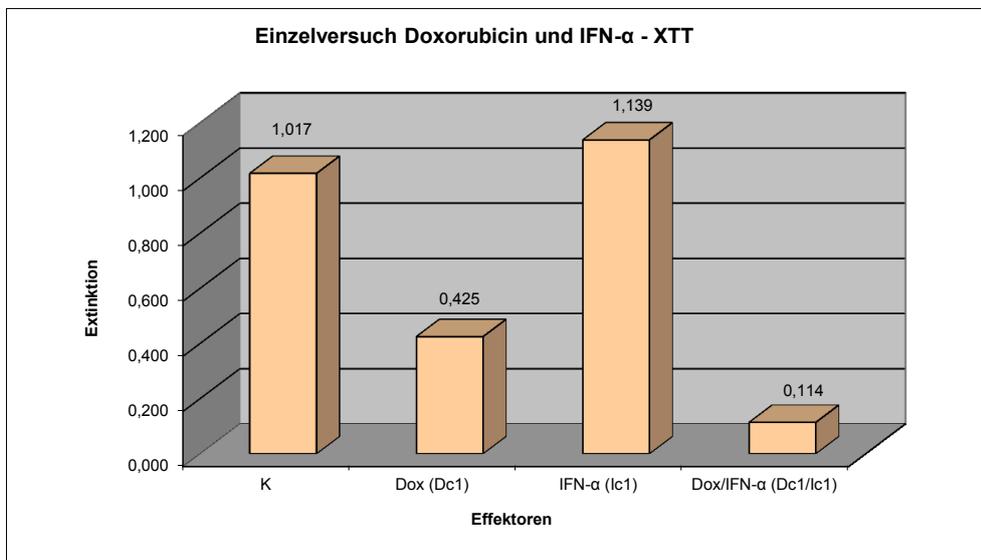


Abb.9: Extinktionen unter Doxorubicin bzw. IFN- α und einer ausgewählten Kombination

Zur Verdeutlichung wurden im Diagramm die Extinktionswerte einer möglichen Kombination zweier Einzelsubstanzen dargestellt. Unverkennbar sind der Abfall der Extinktion unter Gabe von Doxorubicin, eine ähnliche Extinktion wie in der Kontrolle nach Gabe von IFN- α und eine sehr niedrige Extinktion in der Kombination der Einzelsubstanzen unter Einsatz der gleichen Konzentration.

Alle eingesetzten Substanzen wurden in gleicher Weise miteinander kombiniert und die Extinktionswerte einer Zellkultur miteinander verglichen. Auf diese Weise wurde jede Zelllinie untersucht. Die Daten wurden zusammengefasst und sind in den folgenden Abschnitten ausführlich dargestellt.

Stoffwechselumsatzmessung mittels XTT

Die Wirkungen der verschiedenen NF- κ B-Inhibitoren in Kombination mit dem Zytostatikum Doxorubicin sind in Tabelle 12A und 12B zusammengefasst.

0 Ergebnisse

Tabelle 12A: Effekt von Doxorubicin bzw. potentiellen NF-κB-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – Absolute Häufigkeiten

	K Zyt.	IFN-α				BAY				CAPE				PDTC			
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	20	3	6	7	16	12	5	11	28	3	0	0	3	8	5	2	15
0	5	19	17	5	41	10	17	2	29	15	8	4	27	13	11	7	31
P	0	1	0	1	2	1	1	0	2	5	15	9	29	1	6	3	10
Σ	25	23	23	13	59	23	23	13	59	23	23	13	59	22	22	12	56

Legende: K Zyt.: Effekt des Zytostatikums in Monotherapie; K Inh.: Effekt des potentiellen NF-κB-Inhibitors in Monotherapie; je c₁ und c₂-Spalte: zusätzlicher Effekt des Inhibitors in der Kombinationstherapie bezogen auf den Effekt des Zytostatikums in der Monotherapie

Tabelle 12B: Effekt von Doxorubicin bzw. potentiellen NF-κB-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Relative Häufigkeiten

	K Zyt.	IFN-α				BAY				CAPE				PDTC			
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	80	13	26	54	27	52	22	85	47	13	0%	0%	5%	36	23	17	27
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%			%	%	%	%	%
0	20	83	74	38	69	43	74	15	49	65	35	31	46	59	50	58	55
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
P	0%	4%	0%	8%	3%	4%	4%	0%	3%	22	65	69	49	5%	27	25	18
										%	%	%	%	%	%	%	%

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

In 80% der untersuchten Zelllinien führte die alleinige Gabe von Doxorubicin bereits zu einer Reduktion der Zellen.

0 Ergebnisse

IFN- α allein hatte in den meisten Fällen keinen Effekt. Durch kombinierte Inkubation mit Doxorubicin ist allerdings eine weitere Reduktion der Zellen möglich und dies insbesondere beim Einsatz einer höheren IFN- α -Konzentration (Ic_2).

Der Inhibitor BAY allein zeigt bereits eine deutliche Wirkung mit Reduktion der Stoffwechselumsätze. Der Effekt des Doxorubicin kann vor allem durch eine höhere Dosierung des Inhibitors (Bc_2) gesteigert werden.

Für CAPE kann allein keine signifikante Wirkung nachgewiesen werden, in der Kombination mit Doxorubicin lässt sich statistisch signifikant gehäuft ein vermehrter Stoffwechselumsatz nachweisen, jedoch keine Reduktion.

PDTC zeigt allein zumindest eine geringe zellreduzierende Wirkung, kann in der Kombination mit dem Zytostatikum Doxorubicin jedoch sowohl reduzierende als auch proliferative Effekte zeigen.

In der folgenden Abbildung werden alle Daten in Form von Boxplots zusammengefasst. Dargestellt sind die Stoffwechselumsätze und damit das Überleben der Zellen für alle untersuchten Kombinationen des Zytostatikums Doxorubicin mit den unterschiedlichen potentiellen NF- κ B-Inhibitoren bezogen auf die Kontrolle (Zellen ohne Zugabe eines Effektors).

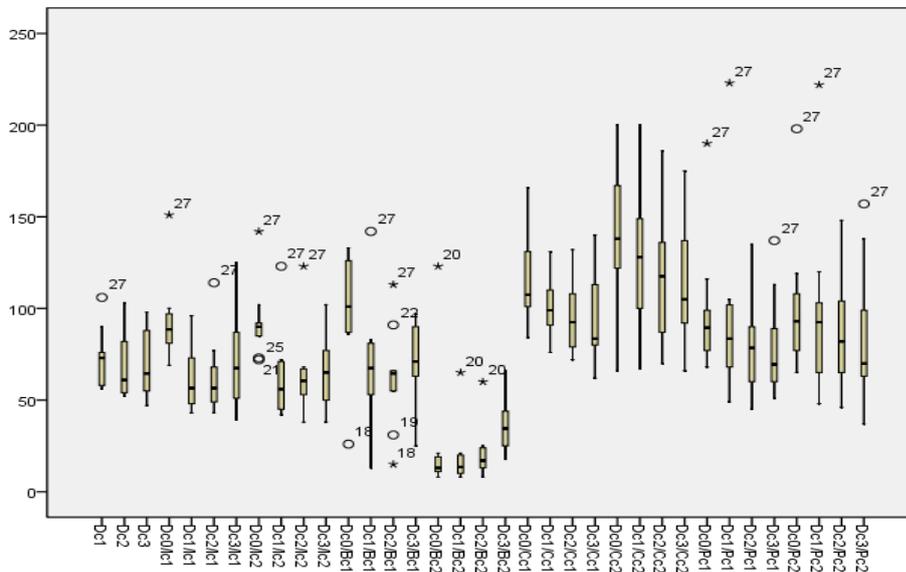


Abb. 10: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit Doxorubicin (Dc0-Dc3) und den entsprechenden NF-κB-Inhibitoren IFN-α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

Auch in den Boxplots zeigt sich die Wirksamkeit von Doxorubicin auf die meisten untersuchten Zelllinien durch eine nur geringfügige Wirkung von IFN-α allein und eine deutlichere Reduktion in der Kombination der beiden Effektoren. Auffällig ist die hohe Streubreite in den Kombinationen mit der c₃-Konzentration Doxorubicin. Dies zeigt sich auch in den Kombinationen mit BAY, ist jedoch für CAPE und PDTC aufgrund der ohnehin hohen Streubreite nicht zu erkennen. Deutlich wird auch der hohe zytotoxische Effekt von BAY in hoher Dosierung (Bc₂).

Die Tabellen 13A und 13B fassen die Ergebnisse der Kombinationen von TNF-α und den Inhibitoren zusammen.

0 Ergebnisse

Tabelle 13A: Effekt von TNF- α bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen TNF- α -Gabe – Absolute Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K	K	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K	Pc ₁	Pc ₂	Σ
	Zyt.	Inh.															
R	2	7	7	3	17	13	4	11	28	1	3	0	4	9	10	2	21
0	21	14	14	7	35	8	17	0	25	13	12	5	30	9	10	6	25
P	1	1	1	1	3	1	1	1	3	8	7	7	22	3	1	3	7
Σ	24	22	22	11	55	22	22	12	56	22	22	12	56	21	21	11	53

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 13B: Effekt von TNF- α bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen TNF- α -Gabe - Relative Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K	K	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K	Pc ₁	Pc ₂	Σ
	Zyt.	Inh.															
R	8%	32%	32%	27%	31%	59%	18%	92%	50%	5%	14%	0%	7%	43%	48%	18%	40%
0	88%	64%	64%	64%	64%	36%	77%	0%	45%	59%	55%	42%	54%	43%	48%	55%	47%
P	4%	5%	5%	9%	5%	5%	5%	8%	5%	36%	32%	58%	39%	14%	5%	27%	13%

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

Für TNF- α allein ist keine signifikante Wirkung auf den Zellumsatz nachzuweisen. Die Kombination mit IFN- α hat bei einem Drittel der untersuchten Zelllinien einen reduktiven Effekt.

Nach Gabe von BAY allein ist auch hier in 60% der Fälle bereits eine Reduktion der Zellen nachweisbar. Beim Einsatz der höheren Konzentration (Bc₂) scheint eine nochmalige Zunahme des Effektes möglich (92%). Dies ist jedoch der Tatsache geschuldet, dass zu Beginn der Versuche nur niedrige Konzentrationen (Bc₁) des Inhibitors eingesetzt wurden (s. Kapitel 4.2.2) und damit auch als Bezugsgröße in der Monotherapie

Kommentar [MSOffice6]: Am Ende noch ergänzen

0 Ergebnisse

nur auf BAY in niedriger Konzentration zurückgegriffen werden konnte. Hier kann BAY nicht in jedem Fall ein Effekt auf die Zellen nachgewiesen werden. In höherer Konzentration ist jedoch die alleinige Gabe des Inhibitors ausreichend, um bei nahezu allen untersuchten Zelllinien einen deutlichen Effekt im Sinne einer Destruktion der Zellen zu erreichen.

Für CAPE kann auch hier keine signifikante Reduktion der Zellen nachgewiesen werden. Es kommt wie oben bereits angeführt zu einem proliferationsfördernden Effekt.

Die Wirkung von PDTC ist sehr heterogen. In fast 50% der untersuchten Tumore bewirkt die alleinige Gabe eine Reduktion der Zellen, bei der gleichen Anzahl Tumore hat PDTC allein keinen Effekt und in Einzelfällen waren eher Stoffwechselumsätze im Sinne einer Proliferation nachweisbar. Die Kombination der Effektoren zeigt, bezogen auf die Wirkung von TNF- α , vor allem die Wirksamkeit von PDTC an; in höheren Dosierungen von PDTC (Pc₂) zeigt sich eher eine Proliferationsneigung.

Abbildung 11 zeigt die zusammengefassten Daten in Form von Boxplots für TNF- α und die NF- κ B-Inhibitoren analog Abbildung 10 für Doxorubicin.

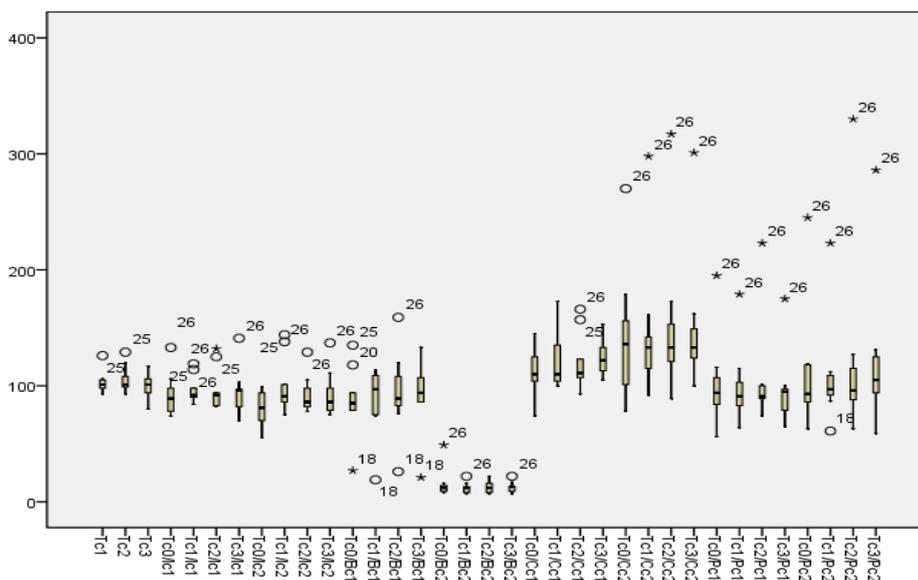


Abb. 11: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit TNF- α (Tc0-Tc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

0 Ergebnisse

In der Abbildung zeigt sich die geringe Effektivität der untersuchten Kombinationen. Allein durch die hochdosierte Gabe von BAY fanden wir in allen untersuchten Tumoren eine erhebliche zytotoxische Wirkung. Vor allem für die Kombinationen mit CAPE wird die Proliferationsneigung deutlich.

Kommentar [MSOffice7]: Kommentar zu Probe 26 notwendig?

Die Ergebnisse für 5-Fluorouracil in Kombination mit IFN- α , BAY, CAPE bzw. PDTC zeigen die folgenden Tabellen (Tabelle 14A und B).

Tabelle 14A: Effekt von 5-Fluorouracil bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – Absolute Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K Zyt.	K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	12	10	6	2	18	14	5	11	30	2	1	0	3	8	7	3	18
0	12	12	16	10	38	8	17	1	26	11	11	3	25	8	10	5	23
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	10	9	28	5	4	4	13
Σ	24	22	22	12	56	22	22	12	56	22	22	12	56	21	21	12	54

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 14B: Effekt von 5-Fluorouracil bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Relative Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K Zyt.	K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	50	45	27	17	32	64	23	92	54	9%	5%	0%	5%	38	33	25	33
	%	%	%	%	%	%	%	%	%				%	%	%	%	%
0	50	55	73	83	68	36	77	8%	46	50	50	25	45	38	48	42	43
	%	%	%	%	%	%	%		%	%	%	%	%	%	%	%	%
P	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	41	45	75	50	24	19	33	24
										%	%	%	%	%	%	%	%

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

0 Ergebnisse

Für 5-Fluorouracil ist in 50% der Fälle beim alleinigen Einsatz eine Reduktion der Zellen nachweisbar. Unter kombinierter Inkubation der Zellen mit IFN- α lässt sich in einigen Fällen ein zusätzlicher Effekt erfassen.

Der Inhibitor BAY verhält sich ebenso wie bereits oben beschrieben. Für CAPE ist auch hier eher ein proliferativer Effekt nachzuweisen. Der Einsatz von PDTC hingegen kann in Abhängigkeit von der Konzentration in 25-30% der untersuchten Tumore eine zusätzliche Reduktion bewirken. Allerdings ist hier ebenfalls ein proliferationsfördernder Effekt möglich (19-33%).

Abbildung 12 zeigt Boxplots mit den zusammengefassten Daten für 5-Fluorouracil und die NF- κ B-Inhibitoren analog Abbildung 10 für Doxorubicin.

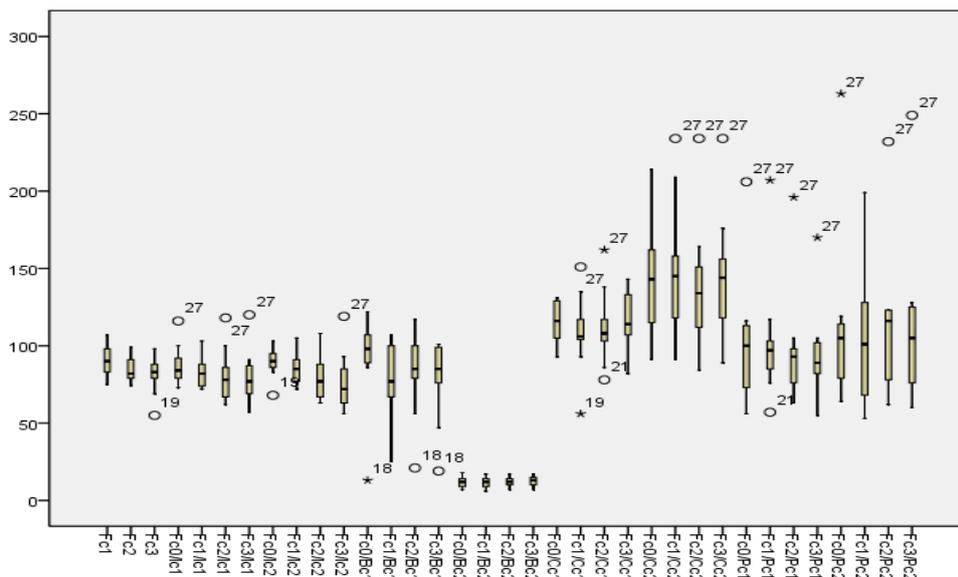


Abb. 12: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit 5-Fluorouracil (Fc0-Fc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

Die Abbildung zeigt für 5-Fluorouracil in Monotherapie eher ein geringes Ausmaß an Abnahme der Stoffwechselaktivitäten, was sich in der Kombination mit IFN- α noch etwas steigern lässt. Auffallend sind auch hier die starken und einheitlichen Effekte unter hochdosierter BAY-Behandlung der Zellen, wohingegen für CAPE vermehrte Stoffwechselumsätze mit hohen Streubreiten zu beobachten sind.

0 Ergebnisse

Die in Zusammenhang mit Gemcitabin und den NF- κ B-Inhibitoren ermittelten Wirkungen sind in Tabelle 15A und 15B zusammengefasst.

Tabelle 15A: Effekt von Gemcitabin bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – Absolute Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K	K	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K	Pc ₁	Pc ₂	Σ
	Zyt.	Inh.															
R	2	8	7	4	19	12	6	10	28	1	3	0	4	5	5	1	11
0	19	11	12	6	29	7	11	0	18	10	8	3	21	9	10	5	24
P	1	1	1	1	3	1	3	1	5	9	9	8	26	5	4	4	13
Σ	22	20	20	11	51	20	20	11	51	20	20	11	51	19	19	10	48

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 15B: Effekt von Gemcitabin bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Relative Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K	K	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K	Pc ₁	Pc ₂	Σ
	Zyt.	Inh.															
R	9%	40%	35%	36%	37%	60%	30%	91%	55%	5%	15%	0%	8%	26%	26%	10%	23%
0	86%	55%	60%	55%	57%	35%	55%	0%	35%	50%	40%	27%	41%	47%	53%	50%	50%
P	5%	5%	5%	9%	6%	5%	15%	9%	10%	45%	45%	73%	51%	26%	21%	40%	27%

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

Für Gemcitabin ist ähnlich dem TNF- α bei alleiniger Gabe kein Effekt nachzuweisen. Die Inhibitoren verhalten sich auch hier wie bereits oben beschrieben in Form einer Reduktion der Zellen in 1/3 der Fälle bei Zugabe des IFN- α , einer deutlichen Reduktion der Zellen

mit BAY sowie einem dem proliferativen Effekt von CAPE und sowohl proliferativen als auch reduzierenden Eigenschaften von PDTC.

Die Boxplots in Abbildung 13 dienen der weiteren Veranschaulichung dieser Ergebnisse.

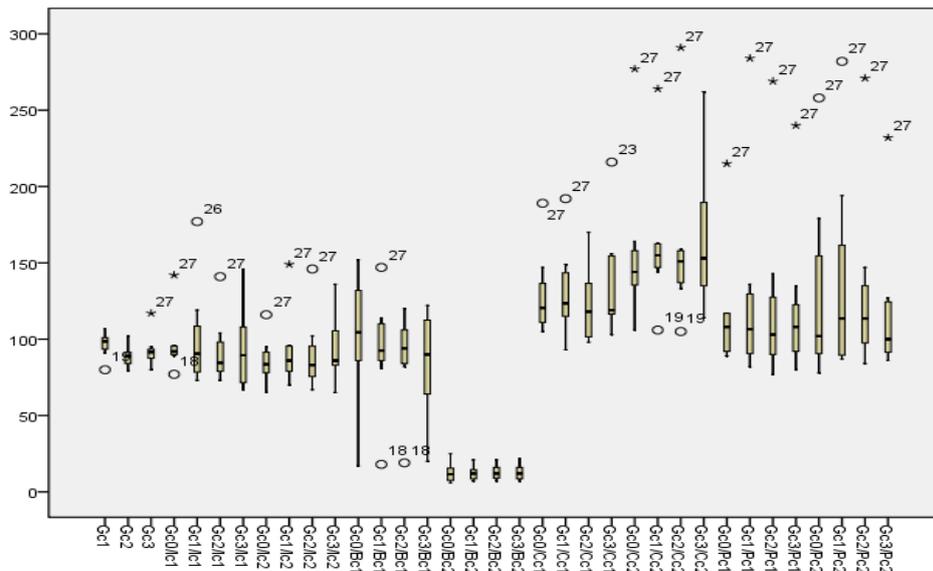


Abb. 13: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit Gemcitabin (Gc0-Gc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

Zusammenfassung:

Von den Zytostatika hatte Doxorubicin die deutlichste Wirkung. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Gabe von IFN- α in einigen Fällen noch verstärkt werden. Auch 5-Fluorouracil reduziert die Stoffwechselumsätze - jedoch in deutlich weniger Fällen. Gemcitabin und TNF- α bleiben ohne signifikante Wirkung.

Von den Inhibitoren zeigt vor allem BAY in hoher Konzentration in nahezu allen Fällen zumeist auch eine fast vollständige Reduktion der Zellzahlen. Der Einsatz von IFN- α führt in ca. 1/3 der Fälle zu einer Reduktion der Zellen, wie auch unter PDTC. Die Behandlung mit diesem Effektor führt jedoch ebenso zu einer Proliferation der Zellen in verschiedenen primären Tumorzellkulturen. CAPE zeigt fast ausschließlich eine proliferationsfördernde Wirkung und erscheint somit zur Tumorreduktion nicht geeignet.

0 Ergebnisse

Proteinmengenbestimmung mittels Kristallviolett

Die Tabellen 16A und B demonstrieren die Ergebnisse der Kombinationen von Doxorubicin und den NF- κ B-Inhibitoren in der Kristallviolettfärbung.

Tabelle 16A: Effekt von Doxorubicin bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – Absolute Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K Zyt.	K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	13	7	8	7	22	12	5	12	29	12	3	10	25	9	5	9	23
0	1	5	4	5	14	0	7	0	7	0	9	2	11	2	6	2	10
P	0	0	0	0	0												
Σ	14	12	12	12	36	12	12	12	36	12	12	12	36	11	11	11	33

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 16B: Effekt von Doxorubicin bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Relative Häufigkeiten

	IFN- α					BAY				CAPE				PDTC			
	K Zyt.	K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	93	58	67	58	61	100	42	100	81	100	25	83	69	82	45	82	70
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0	7%	42	33	42	39	0%	58	0%	19	0%	75	17	31	18	55	18	30
		%	%	%	%		%		%		%	%	%	%	%	%	%
P	0%	0%	0%	0%	0%												

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

In nahezu allen Versuchen führt die alleinige Gabe von Doxorubicin zu einer Reduktion der Zellzahl. In der Hälfte der Fälle kann eine Reduktion auch durch die Gabe von IFN- α

0 Ergebnisse

in der Monotherapie nachgewiesen werden, in der Kombination beider Substanzen ist oft eine weitere Reduktion erreichbar.

Unter der Behandlung mit dem NF- κ B-Inhibitor BAY kommt es in allen Fällen zu einer Zellreduktion, auch kann in der Kombination durch BAY in höherer Konzentration (Bc₂) stets eine Wirkungssteigerung des Zytostatikums Doxorubicin erreicht werden.

Die alleinige Gabe von CAPE führt in allen Versuchen zu einer Reduktion der Proteinbestandteile, in der Kombination kann mit einer niedrigen Dosis (Cc₁) in lediglich 25% eine zusätzliche Reduktion, hingegen mit einer höheren Dosis (Cc₂) in 83% ein zusätzlicher Effekt erreicht werden.

Für PDTC kann ein ähnliches Verhaltensmuster nachgewiesen werden. Unter alleiniger Gabe wird meist eine Reduktion der Zellen erreicht, die Verabreichung einer geringen Dosis Inhibitor (Pc₁) in der Kombination mit Doxorubicin zeigt hier in etwa 50% der Versuche einen zusätzlichen Effekt, bei einer höheren Dosis (Pc₂) in nahezu allen Fällen.

Abbildung 14 fasst die Ergebnisse zusammen.

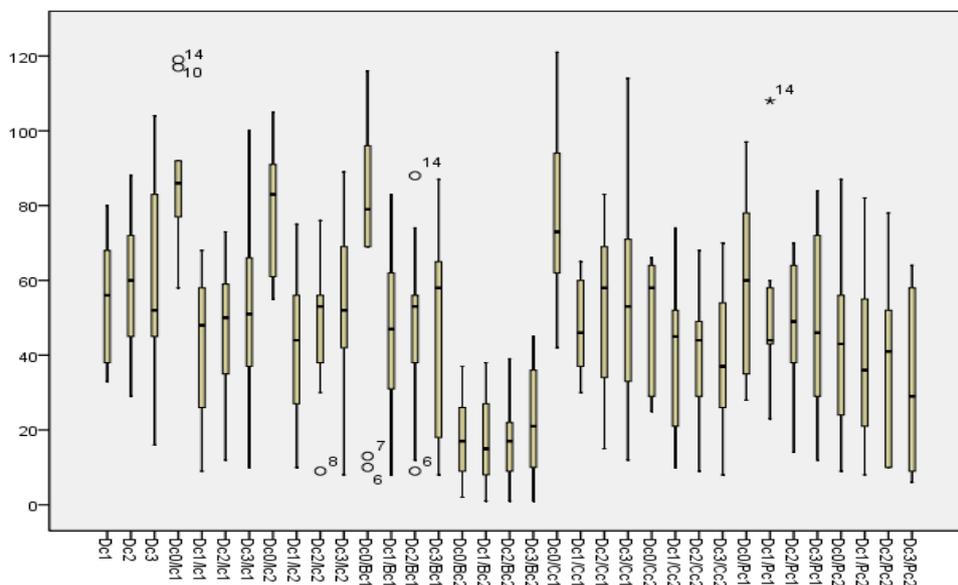


Abb. 14: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit Doxorubicin (Dc0-Dc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

0 Ergebnisse

In Tabelle 17A und B sind die Ergebnisse für die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von TNF- α und den NF- κ B-Inhibitoren dargestellt.

Tabelle 17A: Effekt von TNF- α bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation.
Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen TNF- α -Gabe – Absolute Häufigkeiten

	K Zyt.	IFN- α				BAY				CAPE				PDTC			
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	0	6	3	4	13	12	6	12	30	11	8	11	30	10	9	9	28
0	13	6	9	8	23	0	6	0	6	0	4	1	5	0	2	2	4
P	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Σ	14	12	12	12	36	12	12	12	36	12	12	12	36	11	11	11	33

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 17B: Effekt von TNF- α bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation.
Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen TNF- α -Gabe - Relative Häufigkeiten

	K Zyt.	IFN- α				BAY				CAPE				PDTC			
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	0%	50	25	33	36	100	50	100	83	92	67	92	83	91	82	82	85
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0	93	50	75	67	64	0%	50	0%	17	0%	33	8%	14	0%	18	18	12
	%	%	%	%	%		%		%		%		%		%	%	%
P	7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	0%	0%	3%	9%	0%	0%	3%

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

Durch die alleinige Gabe von TNF- α ist kein Effekt auf die Vermehrung der Zellen nachweisbar. Unter der Behandlung mit IFN- α zeigt sich in 50% der untersuchten Zelllinien eine Abnahme der Zellzahl, in der Kombination mit TNF- α wird dieser Effekt jedoch in deutlich weniger Versuchsansätzen erreicht.

Der Inhibitor BAY erbringt in der Kombination mit TNF- α die gleichen Ergebnisse wie in der Kombination mit Doxorubicin.

0 Ergebnisse

Auch CAPE und PDTC zeigen die gleichen Reaktionsmuster wie in der Kombination mit Doxorubicin. Lediglich bei jeweils einer Zelllinie führt die alleinige Gabe des entsprechenden Inhibitors zu einem proliferativen Effekt. PDTC demonstriert auch in niedriger Dosierung (Pc_1) eine deutliche zellzahlreduzierende Wirkung.

Zur weiteren Veranschaulichung der Ergebnisse und zur Darstellung des Ausmaßes der Wirkungen der verschiedenen Kombination von Effektoren auf die Zellen dient Abbildung 15.

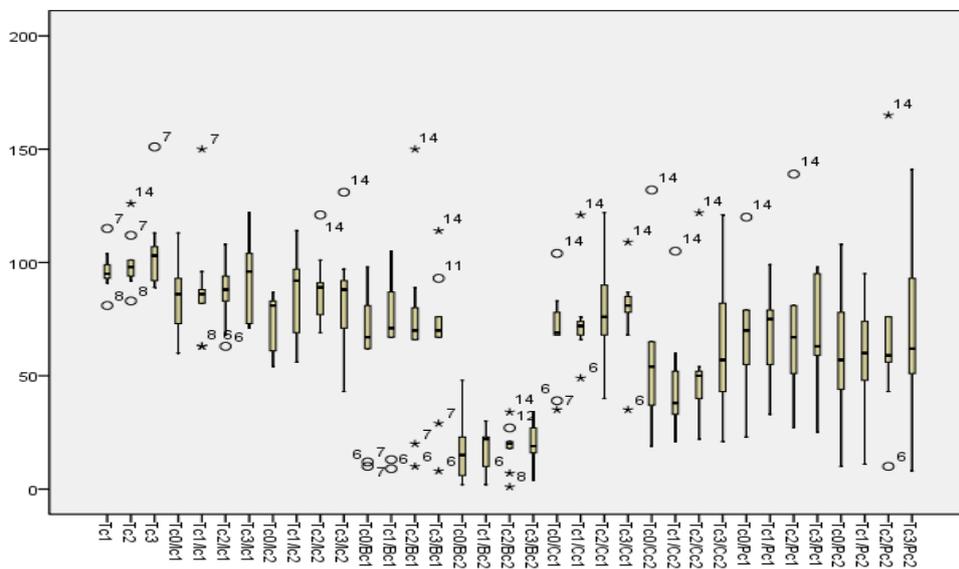


Abb. 15: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit TNF- α (Tc0-Tc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

Die Ergebnisse der Kombinationen von 5-Fluorouracil und den NF- κ B-Inhibitoren fassen Tabelle 18A und B zusammen.

0 Ergebnisse

Tabelle 18A: Effekt von 5-Fluorouracil bzw. potentiellen NF-κB-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – Absolute Häufigkeiten

	IFN-α					BAY				CAPE				PDTC			
	K Zyt.	K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	6	4	2	3	9	12	7	12	31	10	7	10	27	9	7	8	24
0	8	8	9	8	25	0	5	0	5	2	4	2	8	2	4	3	9
P	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Σ	14	12	12	12	36	12	12	12	36	12	12	12	36	11	11	11	33

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 18B: Effekt von 5-Fluorouracil bzw. potentiellen NF-κB-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Relative Häufigkeiten

	IFN-α					BAY				CAPE				PDTC			
	K Zyt.	K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	43	33	17	25	25	100	58	100	86	83	58	83	75	82	64	73	73
	%	%	%	%	%												
0	57	67	75	67	69	0%	42	0%	14	17	33	17	22	18	36	27	27
	%	%	%	%	%		%		%	%	%	%	%	%	%	%	%
P	0%	0%	8%	8%	6%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	0%	3%	0%	0%	0%	0%

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

Die mit einer Monotherapie 5-Fluorouracil behandelten Zellen wiesen in etwa der Hälfte der Fälle eine Reduktion der Zellzahl auf. Bei den übrigen Zelllinien war kein Effekt zu erfassen. Unter zusätzlicher Gabe von IFN-α war in maximal ¼ der untersuchten Zellen ein zusätzlicher Effekt nachweisbar; in mit BAY behandelten Zellen konnte unter kombinierter Inkubation allein mit hoher Dosis des Inhibitors (Bc₂) bei allen Zelllinien eine zusätzliche Reduzierung der Zellzahl nachgewiesen werden.

0 Ergebnisse

Auch die Inhibitoren CAPE und PDTC zeigen eine sehr gute Wirksamkeit sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombination mit dem Zytostatikum.

Abbildung 16 zeigt Boxplots mit den zusammengefassten Daten für 5-Fluorouracil und die NF- κ B-Inhibitoren.

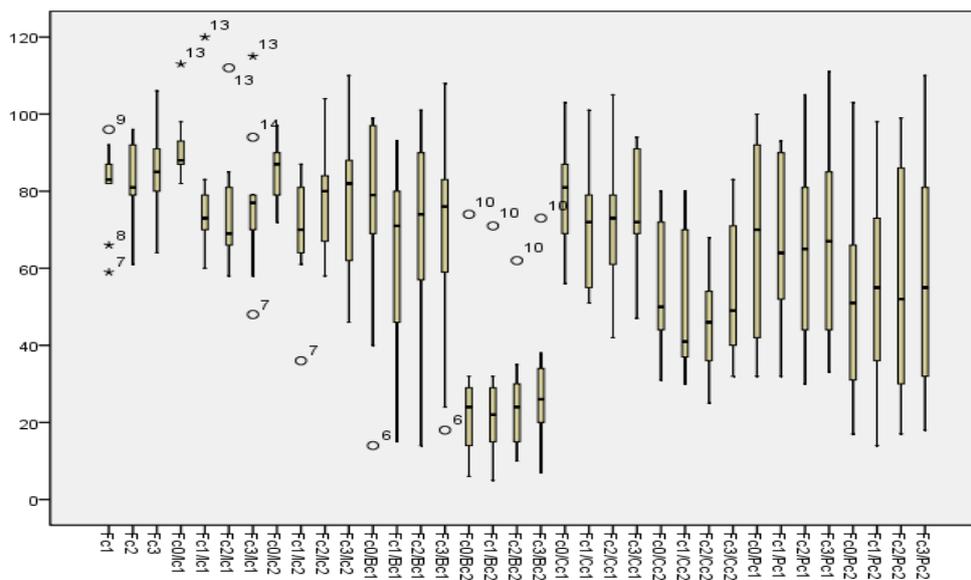


Abb. 16: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit 5-Fluorouracil (Fc0-Fc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

Die Wirkungen des Zytostatikums Gemcitabin in der Kombination mit den verschiedenen NF- κ B-Inhibitoren zeigen Tabelle 19A und B.

0 Ergebnisse

Tabelle 19A: Effekt von Gemcitabin bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe – Absolute Häufigkeiten

	K Zyt.	IFN- α				BAY				CAPE				PDTC			
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	3	6	5	4	15	12	6	12	30	10	5	9	24	9	7	9	25
0	10	5	5	7	17	0	6	0	6	1	5	2	8	1	3	1	5
P	1	1	2	1	4	0	0	0	0	1	2	1	4	1	1	1	3
Σ	14	12	12	12	36	12	12	12	36	12	12	12	36	11	11	11	33

Legende: analog Tabelle 12A; absolute Häufigkeiten

Tabelle 19B: Effekt von Gemcitabin bzw. potentiellen NF- κ B-Inhibitoren auf die Zellproliferation. Vergleich verschiedener Kombinationen mit der alleinigen Zytostatikagabe - Relative Häufigkeiten

	K Zyt.	IFN- α				BAY				CAPE				PDTC			
		K Inh.	Ic ₁	Ic ₂	Σ	K Inh.	Bc ₁	Bc ₂	Σ	K Inh.	Cc ₁	Cc ₂	Σ	K Inh.	Pc ₁	Pc ₂	Σ
R	21 %	50 %	42 %	33 %	42 %	100 %	50 %	100 %	83 %	83 %	42 %	75 %	67 %	82 %	64 %	82 %	76 %
0	71 %	42 %	42 %	58 %	47 %	0% %	50 %	0% %	17 %	8% %	42 %	17 %	22 %	9% %	27 %	9% %	15 %
P	7% %	8% %	17 %	8% %	11 %	0% %	0% %	0% %	0% %	8% %	17 %	8% %	11 %	9% %	9% %	9% %	9% %

Legende: analog Tabelle 12A; relative Häufigkeiten

Nach Gabe des Zytostatikums war nur in 20% der untersuchten Zelllinien eine Abnahme der Zellzahl zu erfassen. In der Kombination mit den verschiedenen Inhibitoren waren die gleichen Ergebnisse nachzuvollziehen wie in den bereits beschriebenen Kombinationen mit den anderen Zytostatika und TNF- α .

Abbildung 17 fasst die Ergebnisse zusammen.

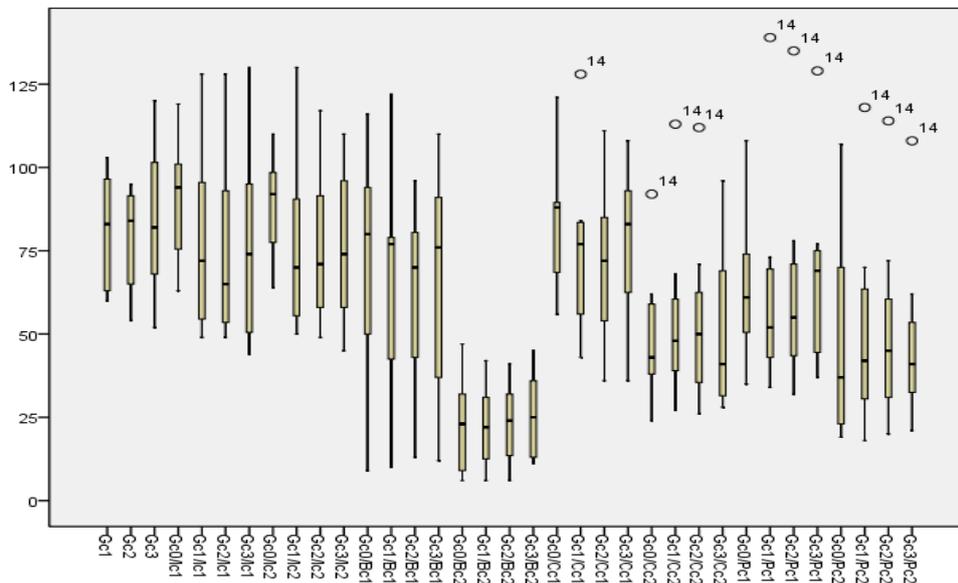


Abb. 17: Relatives Überleben der Zellen in allen untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit Gemcitabin (Gc0-Gc3) und den entsprechenden NF- κ B-Inhibitoren IFN- α (Ic1/Ic2), BAY (Bc1/Bc2), CAPE (Cc1/Cc2) und PDTC (Pc1/Pc2); Abszisse = Bezeichnung der Kombinationen der Effektoren, Ordinate = Relatives Überleben

Zusammenfassung:

Auch mit dieser Nachweismethode ist Doxorubicin das wirksamste Zytostatikum der Versuchsreihe. Die Gabe von 5-Fluorouracil führt bei einem Teil der untersuchten Zelllinien zu einer Reduktion der Proteinmenge. Die Behandlung mit TNF- α und Gemcitabin hatte nur in wenigen Fällen einen Effekt auf die Zellen.

Die zusätzliche Gabe von NF- κ B-Inhibitoren (und IFN- α) konnte in vielen Fällen einen zusätzlichen Effekt demonstrieren. Hervorzuheben ist hier der Inhibitor BAY, der in allen Fällen zu einer Zellzahlreduktion führte; in hoher Konzentration (Bc₂) verabreicht war meist ein Zellüberleben von weniger als 20% zu beobachten. IFN- α , CAPE und PDTC weisen eine geringere Wirksamkeit auf.

Im Vergleich der beiden Nachweismethoden kann festgestellt werden, dass sowohl in der Messung des Stoffwechselumsatzes mittels XTT als auch im Proteinnachweis mit Kristallviolett Doxorubicin das wirksamste der untersuchten Zytostatika (und TNF- α) war. Weiterhin konnte in einer signifikanten Anzahl von Zellkulturen auch für 5-Fluorouracil eine Wirksamkeit nachgewiesen werden.

0 Ergebnisse

In der Beurteilung der Effekte getesteter Inhibitoren ergaben sich jedoch einige Unterschiede, insbesondere bei CAPE und PDTC. Der in der XTT-Färbung signifikante Anteil an proliferativen Effekten, insbesondere bei CAPE, war mit der Kristallviolett-färbung nicht nachvollziehbar. Proliferation kann dabei sowohl einer echten Zunahme der Zellzahl (in überwiegender Zahl der Fälle zutreffend) als auch einer Minderung des proliferationshemmenden Effektes des Zytostatikums entsprechen.

Stimulation der transfizierten Primärkulturen mit IL-2, IFN- α und Zytostatika

Eine Transfektion wurde in 27 Zelllinien angestrebt und war in 8-10 Fällen erfolgreich, so dass diese Kulturen ausgewertet wurden.

Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben. Systematisch wurden auf den Deckgläschen die transfizierten, GFP-positiven Zellen aufgesucht und gezählt. Zur Veranschaulichung wurde die Auszählung der Deckgläschen eines repräsentativen Versuches in Abbildung 18 dargestellt.

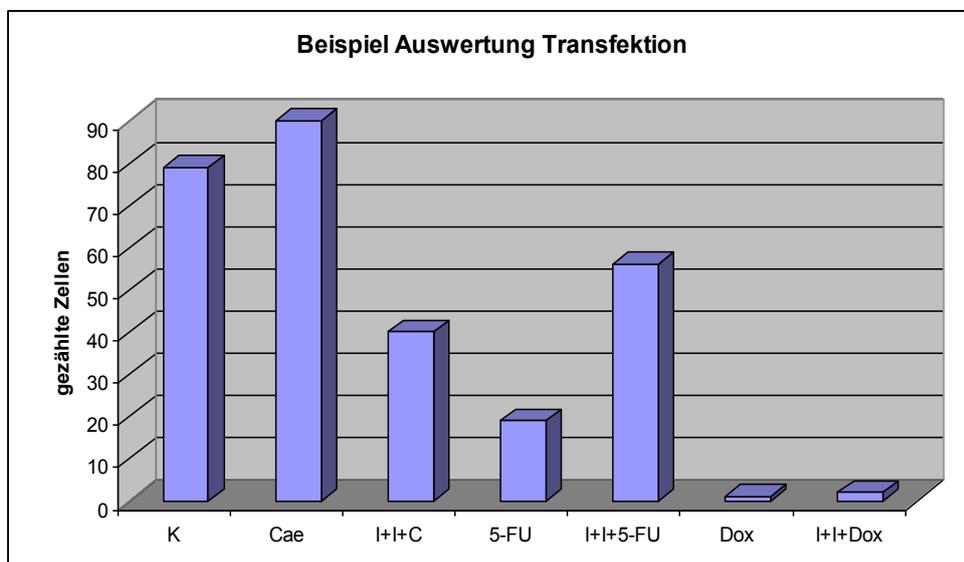


Abb. 18: Auszählung transfizierter Zellen einer Zelllinie (190 p)

Legende: K = Kontrolle, Cae = Caelyx, I+I+C = IL2 + IFN- α + Caelyx, 5-FU = 5-Fluorouracil, I+I+5-FU = IL2 + IFN- α + 5-Fluorouracil, Dox = Doxorubicin, I+I+D = IL2 + IFN- α + Doxorubicin, Konzentrationen s. 4.3.4.

Kommentar [MSOffice8]: Legende?

0 Ergebnisse

In dem gewählten Beispiel waren in der Kontrolle nur 79 GFP-positive Zellen zu zählen. Für die Monotherapie mit dem Zytostatikum Caelyx (CAc₁) wurde eine der Kontrolle vergleichbare Zahl an GFP-positiven Zellen gefunden. In der Kombinationstherapie mit INF- α , IL-2 und dem Zytostatikum Caelyx verringerte sich die Anzahl dieser Zellen auf die Hälfte der Zellzahlen der Kontrolle. Auf dem Deckgläschen, welches mit 5-Fluorouracil allein behandelt wurde, waren nur wenige GFP-positive Zellen nachweisbar, in der Kombination deutlich mehr. Bei den Doxorubicin-behandelten Zellen waren auf den mit Monotherapie und auf den mit Immunchemotherapie behandelten Deckgläschen nur lediglich eine bzw. zwei transfizierte Zellen insgesamt zu finden.

Neben der Anzahl der gezählten transfizierten Zellen floss in die Beurteilung auch die Morphologie dieser Zellen ein (auffällige Mitosen, beginnende bzw. vollzogene Apoptosen). Die darauf folgende Auszählung und Beurteilung der nicht transfizierten Zellen sollte Rückschlüsse über die Auswirkung der transfizierten Plasmide auf die Zellen erlauben.

Eine Wirkung wurde dann als Reduktion bzw. Proliferation gewertet, wenn die Änderung mindestens 20% zur Bezugsgröße betrug.

Ziel der Transfektion mit dem veränderten I κ B war, eine Aktivierung von NF- κ B konsequent zu unterbinden. Demgegenüber stand die Transfektion mit dem konstitutiv aktiven p65- Plasmid zur Erzeugung eines starken NF- κ B-Signals. Nach Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Zytokinen bzw. Zytostatika sollte eingeschätzt werden, welche Auswirkung die Beeinflussung des NF- κ B auf das Verhalten der Zellen hat und ob Unterschiede zwischen der Monotherapie mit den einzelnen Zytostatika und der kombinierten Immunchemotherapie zu finden sind. Die Ergebnisse hierzu sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

pPMECMVI κ B- transfizierte Zelllinien

Die ausgezählten Zellen der Monotherapie mit den Zytostatika Caelyx, 5-Fluorouracil bzw. Doxorubicin wurden, ebenso wie eine kombinierte Behandlung, mit den Zellen der Kontrolle (unbehandelte Zellpopulation) verglichen und eingeteilt in:

0 Ergebnisse

R (Reduktion der Zellzahlen),
 0 (kein Effekt) und
 P (Proliferation der Zellpopulation).

Außerdem wurden die Effekte der unterschiedlichen Behandlungen miteinander verglichen, indem beurteilt wurde, ob die Kombinationstherapie in Bezug auf die Chemotherapie einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt hatte. Die Ergebnisse für die IκB-transfizierte Zellen sind in den Tabellen 20A und B dargestellt.

Tabelle 20A: Ergebnisse der Transfektionen mit IκB-transfizierten Zellen – absolute Zahlen

Bezug Therapie	K Caelyx			K 5-FU			K Dox		
	Caelyx	I+I+C	I+I+C	5-FU	I+I+F	I+I+F	Dox	I+I+D	I+I+D
R	3	4	2	3	3	2	10	10	3
0	5	5	5	6	6	7	0	0	7
P	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Summe	8	9	8	9	9	9	10	10	10

Legende: Erste Zeile: Bezugspunkte (Monotherapie bezogen auf Kontrolle oder Kombinationstherapie verglichen mit Kontrolle bzw. Monotherapie); 2. Zeile: beurteilter Ansatz, I+I+C (F; D) = IL-2 + IFN-α + Caelyx (5-Fluorouracil; Doxorubicin)

Kommentar [MSOffice9]: Legende verständlich?

Tabelle 20B: Ergebnisse der Transfektionen mit IκB-transfizierten Zellen – relative Zahlen

Bezug Therapie	K Caelyx			K 5-FU			K Dox		
	Caelyx	I+I+C	I+I+C	5-FU	I+I+F	I+I+F	Dox	I+I+D	I+I+D
R	38%	44%	25%	33%	33%	22%	100%	100%	30%
0	63%	56%	63%	67%	67%	78%	0%	0%	70%
P	0%	0%	13%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Legende: analog Tbl. 20A

Nach Transfektion mit IκB ließ sich nur in 38% der mit Caelyx behandelten Fälle eine Reduktion der Zellen nachweisen. Die Kombinationstherapie mit zusätzlicher Gabe von IFN-α und IL-2 erbrachte ähnliche Ergebnisse. Bezogen auf die Monotherapie kam es bei 2 Zelllinien unter der Vorbehandlung mit IFNα und IL-2 zu einem zusätzlichen apoptotischen Effekt.

0 Ergebnisse

Mit 5-Fluorouracil konnte in 1/3 der ausgewerteten Zelllinien eine Reduktion der Zellen erreicht werden, ebenso wie in der Kombinationstherapie. In 22% der Fälle, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zelllinien, jedoch in 66% der Zelllinien, die unter Immunchemotherapie Apoptose zeigten, war ein zusätzlicher Effekt der Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie nachweisbar.

Sowohl die Monotherapie mit Doxorubicin als auch die kombinierte Inkubation führte in allen Fällen zu einer Zellzahlreduktion, in 30% der untersuchten Zelllinien ließ sich mit der Kombinationstherapie ein zusätzlicher Effekt nachweisen.

Kommentar [MSOffice10]: Bezug zu den nicht transfizierten Zellen bringen

pCMVINp65- transfizierte Zelllinien

Die Beurteilung der Ergebnisse für die p65-transfizierten Zellen erfolgte in gleicher Weise wie für die mit IκB-transfizierten Zellen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 21A und B dargestellt.

Tabelle 21A: Ergebnisse der Transfektionen mit p65-transfizierten Zellen – absolute Zahlen

Bezug Therapie	Caelyx			5-FU			Dox		
	K Caelyx	I+I+C	I+I+C	K 5-FU	I+I+F	I+I+F	K Dox	I+I+D	I+I+D
R	3	4	3	4	4	2	9	9	4
0	5	4	5	5	5	4	0	0	4
P	0	0	0	0	0	3	0	0	1
Summe	8	8	8	9	9	9	9	9	9

Legende: analog Tbl. 20A

Tabelle 21B: Ergebnisse der Transfektionen mit p65-transfizierten Zellen – relative Zahlen

Bezug Therapie	Caelyx			5-FU			Dox		
	K Caelyx	I+I+C	I+I+C	K 5-FU	I+I+F	I+I+F	K Dox	I+I+D	I+I+D
R	38%	50%	38%	44%	44%	22%	100%	100%	44%
0	63%	50%	63%	56%	56%	44%	0%	0%	44%
P	0%	0%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	11%

Legende: analog Tbl. 20A

Bei mit p65-transfizierten Zellen war in drei von acht Fällen eine Reduktion der Zellzahlen nach Behandlung mit Caelyx nachweisbar, unter kombinierter Inkubation mit Zytokinen in vier von acht der untersuchten Tumorzelllinien. Im Vergleich zur Monotherapie wurde bei drei von insgesamt acht untersuchten Tumoren ein zusätzlicher Effekt erzielt.

Sowohl die alleinige Therapie mit 5-Fluorouracil als auch die Kombination mit IL-2 und IFN- α erbrachte eine Abnahme der Zellzahl in fast der Hälfte der untersuchten Zelllinien. In 22% der Fälle wurde mit der Kombinationstherapie ein zusätzlicher Effekt nachgewiesen, in ebenfalls 22% der ausgewerteten Zellen jedoch eine Verminderung des Effektes, was sich in einer geringeren Wirksamkeit der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ausdrückt.

Die mit Doxorubicin behandelten Zelllinien zeigten ebenso wie die in Kombination inkubierten Zelllinien alle eine Reduktion der Zellzahlen, in vier Fällen brachte die Kombination einen zusätzlichen Effekt, in einem Fall jedoch auch eine Verminderung des Effektes. Allerdings muss bedacht werden, dass der Effekt von Doxorubicin in allen Fällen so stark war, dass nur einzelne Zellen nachweisbar waren (wie Abb.18).

Zusammenfassung der Experimente mit transfizierten Zellen

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Untersuchungen der p65- und I κ B-transfizierten Zellen, so muss festgestellt werden, dass keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Zellen zu finden sind. Es fiel eher auf, dass in fünf der untersuchten Zelllinien deutlich weniger GFP-positive Zellen bei den p65-transfizierten Zellen nachweisbar waren als bei den I κ B-transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt), was so nicht zu erwarten war.

Obwohl für die Doxorubicin-behandelten Zellen bei allen untersuchten Zelllinien eine dramatische Reduktion der GFP-positiven Zellen nachweisbar war, konnte dies nicht für die nicht-transfizierten Zellen auf den Deckgläschen gesagt werden. Auf den Deckgläschen der mit p65-transfizierten Zellen führte die Behandlung mit Doxorubicin oder der Kombinationstherapie nur in zwei von neun Zelllinien zu einer sichtbaren Reduktion der nicht-transfizierten Zellen, auf den Deckgläschen der mit I κ B-transfizierten Zellen bei zwei von elf der untersuchten Zelllinien.

Für die anderen untersuchten Zytostatika und die Kombinationen war eine Verringerung der Gesamtzellzahl nur bei einer Zelllinie unter der Behandlung mit Caelyx und der

0 Ergebnisse

Kombinationstherapie sowohl für p65- als auch I κ B-transfizierte Zellen, für eine weitere Zelllinie bei der Immunchemotherapie der p65-transfizierten Zellen und für eine Zelllinie bei Behandlung mit der Immunchemotherapie mit 5-Fluorouracil der p65-transfizierten Zellen nachweisbar.

Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse sprechen deutlich für eine Abhängigkeit der Zellzahlreduktion von der NF- κ B-Regulierung. Wäre der Effekt der Behandlungen unabhängig von der Modulierung des NF- κ B, so wäre der jeweilige Effekt auch für die auf den Deckgläschen befindlichen nicht transfizierten Zellen zu erwarten gewesen. Damit wäre in den Fällen der nachgewiesenen Apoptose eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl zu erwarten gewesen.

Diskussion

Untersuchungen mit NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika

Die einzelnen Effektoren

Bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms stellt die operative Entfernung des Tumors die einzig kurative Therapieoption dar. Da alle anderen bereits beschriebenen Therapieoptionen lediglich palliativen Charakter mit meist schlechten Ansprechraten und nur geringer Verlängerung der Lebenserwartung, dafür aber oft schwere Nebenwirkungen haben, gibt es vielfältige Anstrengungen zur Verbesserung der Wirkung bestehender Therapien bzw. Etablierung neuer Strategien.

Ein in den letzten Jahren viel untersuchter Transkriptionsfaktor ist das NF- κ B, das vor allem durch die ihm zugeschriebene Hemmung von Apoptosemechanismen und sein ubiquitäres Auftreten für uns von großer Relevanz war. Eine Förderung der Apoptose durch Hemmung von NF- κ B könnte so zu einem vermehrten Zellsterben führen.

Da ein unterschiedliches Verhalten von permanenten und primären Tumorzelllinien möglich ist, wurden zuerst eine permanente Nierenzellkarzinomzelllinie (A 498) und eine ebenfalls etablierte Kolonkarzinomzelllinie (HT 29) untersucht. Um der Frage nach einer möglichen Beeinflussbarkeit des Tumorwachstums durch NF- κ B-Hemmung auf den Grund zu gehen, wurden die Tumorzelllinien mit verschiedenen potenziellen NF- κ B-Inhibitoren behandelt.

Vergleicht man die Ergebnisse miteinander, so fällt auf, dass in der Stoffwechselumsatzmessung für HT 29

- lediglich die mit Doxorubicin versetzten Zellen isoliert mit einem verminderten Stoffwechselumsatz reagieren,
- nach Vorbehandlung mit IFN- α auch die anderen Zytostatika und TNF- α zu einer Reduktion des Stoffwechselumsatzes führen,
- die eingesetzten NF- κ B-Inhibitoren allein ohne Effekt waren.

Im Vergleich dazu ist für die Zellen von A 498 zu postulieren, dass

- sie in gleicher Weise bei der Kombination von Doxorubicin und IFN- α reagieren,
- die Gabe von IFN- α jedoch keinen Einfluss auf die Wirkung der anderen Zytostatika hat,

- für den Einsatz hoher BAY-Konzentrationen eine Reduktion des Stoffwechselumsatzes nachweisbar ist.

Die Proteinmengenbestimmung mit Kristallviolett zeigt für HT 29

- lediglich für die Kombination von Doxorubicin und IFN- α bzw. Doxorubicin und CAPE eine Reduktion der Proteinmenge,
- dass der Einsatz von TNF- α eher zu einer Zunahme der Proteinmenge führt.

Demgegenüber ist bei A 498

- eine Reduktion der Proteinmenge für alle eingesetzten Zytostatika nachweisbar, mit Verstärkung durch die NF- κ B-Inhibitoren und IFN- α ,
- TNF- α ohne Effekt.

Rhode und Mitarbeiter (Rhode et al. 1998) konnten für diese Zelllinie eine höhere Toxizität von Gemcitabin gegenüber dem ebenfalls klinisch angewendeten Vinblastin nachweisen. Eine Sensibilisierung der A 498-Zellen durch IFN- α für Gemcitabin konnte von ihnen jedoch nicht gefunden werden.

Viele verschiedene Studien, welche die Wirkungen von Zytostatika auf Nierenzellkarzinome untersuchten, haben deutlich gezeigt, dass diese Tumore eine Resistenz aufweisen. Keine der untersuchten Substanzen wies eine Ansprechrate von mehr als 20% auf. Die Untersuchung der Kulturen der primären Nierenzellkarzinome ergab einen sehr großen Effekt von Doxorubicin auf die Zellen, was in 80% der untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion des Stoffwechselumsatzes bzw. der Proteinmenge führte. Für Doxorubicin war damit ein stärkerer Effekt nachweisbar als für das lange Zeit in der klinischen Anwendung genutzte 5-Fluorouracil, welches lediglich bei 50% der untersuchten Zelllinien zu einer Reduktion des Stoffwechselumsatzes und der Proteinmenge führte. In der Literatur wurden für die Monotherapie mit 5-Fluorouracil Ansprechraten von 5-8% beschrieben. Gemcitabin wirkt lediglich in 2 von 22 Fällen (9%). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen von Rhode und Mitarbeitern (Rhode et al. 1996) mit Ansprechraten von 8% unter Monotherapie bei in vivo-Untersuchungen.

Für die NF- κ B-Inhibitoren wurden stellvertretend die Daten für BAY und CAPE dargestellt. Bei Einsatz von BAY in niedriger Konzentration (Bc_1) konnte in 20% der untersuchten Fälle eine Reduktion des Stoffwechselumsatzes und bei 42% eine Verminderung der Proteinmenge und nach Behandlung mit der hohen Konzentration (Bc_2)

in nahezu allen Fällen eine Reduktion von Stoffwechselumsatz und Proteinmenge nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Pierce (Pierce et al. 1997) hatte diesen NF- κ B-Inhibitor an endothelialen Zellen getestet und dabei mit 20 μ M als höchster Konzentration ähnlich starke Effekte erzielt. Auch sie konnten eine dosisabhängige Wirkung erkennen. Sie wiesen eine Hemmung der TNF- α induzierten IL-6 und IL-8 Produktion, eine Hemmung der nukleären Translokation von NF- κ B (vollständig bei 20 μ M, entspricht Bc₂) sowie die Hemmung der TNF- α -induzierten I κ B- α -Phosphorylierung und irreversible Stabilisierung von I κ B- α nach. Außerdem fanden sie ebenfalls, von diesen Effekten unabhängige, reversible Wirkungen auf die Tyrosin-Phosphorylierung, die jedoch noch nicht genauer bestimmbar waren. Es wurde jedoch bereits beschrieben, dass Tyrosinkinaseinhibitoren die Signalübertragung von NF- κ B und I κ B- α hemmen (Singh und Aggarwal 1995).

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit CAPE stellen sich ganz anders dar. Ursächlich hierfür könnte ein von BAY abweichender Wirkmechanismus sein. Auch bei CAPE ist der genaue Angriffspunkt nicht bekannt. Die Arbeitsgruppe um Natarajan und Kollegen, die sich intensiv mit der Erforschung von CAPE und seinen Varianten beschäftigen, konnte zumindest zeigen, dass CAPE nicht über die Hemmung der I κ B- α -Degradation wirkt, sondern die Interaktion von NF- κ B-Proteinen mit der DNA supprimiert (Natarajan et al. 1996).

Während in der XTT-Bestimmung fast ausschließlich proliferative Effekte nachweisbar waren, stellte die Kristallviolett-färbung die Substanz als potenten NF- κ B-Inhibitor mit Verstärkung der Wirkung der Zytostatika dosisabhängig in bis zu 67% für Cc₁ und bis 92% in Cc₂ dar. Vor allem in der Cc₁-Konzentration kann man erkennen, dass die größten zusätzlichen Verringerungen der Zellzahlen bei den Effektoren zu finden sind, die die geringste Eigenwirkung haben (TNF- α), wohingegen bei Doxorubicin, welches von den Zytostatika den größten Effekt bei alleiniger Gabe erzielt, eine zusätzliche Gabe von niedrig dosiertem CAPE die geringsten zusätzlichen Erfolge brachte.

Versucht man, die Ergebnisse bei Anwendung des XTT zu interpretieren, sind die Untersuchungen von Gokcimen et al. zu erwähnen, die die protektiven Wirkungen von CAPE auf die Hepatotoxizität von Doxorubicin beschrieben (Gokcimen et al. 2007). Eine Aktivierung von Zellschutzmechanismen würde den erhöhten Stoffwechselumsatz vitaler Zellen erklären.

IFN- α scheint außer der Aktivierung von zytotoxischen Zellen eine direkte antitumorale Aktivität zu besitzen. Dabei werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Es wird die Expression des Klasse-I-Genes auf MHC durch IFN- α stimuliert (Ten et al. 1993). Daneben hemmt IFN- α die Zellproliferation unter anderem durch eine Regulierung der Proteinsynthese, was sich in einer Hemmung des Zellzyklus während der S-Phase zeigt (Murphy et al. 1999). Damit kann IFN- α in einer Kombinationstherapie mit 5-Fluorouracil die Zytotoxizität deutlich erhöhen. Der dem zugrunde liegende Mechanismus beinhaltet einen erhöhten Fluorouracilanabolismus, sowie die Hemmung der Thymidilatsynthese, die Stimulation der Thymidin- und Uridinphosphorylaseaktivität, eine größere DNA-Schädigung und eine erhöhte Lyse von Tumortargets, vermittelt durch natürliche Killerzellen (Grem et al. 1995).

Für PDTC divergierten die Ergebnisse ebenfalls deutlich in den unterschiedlichen Nachweismethoden. Im XTT-Assay traten paradoxe Phänomene unter PDTC auf, die sich als Proliferationseffekte darstellten, wie sie auch von Sunil und Kollegen gezeigt wurden, die sich in einem Ansteigen bestimmter Chemokine äußerte, die aufgrund der bekannten Wirkmechanismen von PDTC gehemmt werden sollten (Sunil et al. 2010). In der Proteinmengenbestimmung mit Kristallviolett zeigten sich jedoch deutliche Effekte, die auf eine Abnahme der Zellmasse hinweisen und damit die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Liu und Morais (Liu et al. 1999) bestätigten. Hervorzuheben ist der deutliche Effekt der Kombination von Doxorubicin und PDTC, da Doxorubicin bereits eine Wirksamkeit in nahezu allen untersuchten Tumorzelllinien zeigt, welche durch PDTC noch verbessert werden konnte. Damit stellt sich PDTC in Betrachtung der Ergebnisse der Kristallviolettfärbung als möglicher Partner einer Kombination aus NF- κ B-Inhibitor und Zytostatikum dar.

Doxorubicin ist ein für das Nierenzellkarzinom häufig untersuchtes Zytostatikum. In den bisherigen Untersuchungen führte es aufgrund der hohen „Multi drug Resistance“, vermittelt durch das MDR-1-Gen zu nur unbefriedigenden Ergebnissen (Mickisch et al. 1990). In unseren Untersuchungen stellte sich Doxorubicin jedoch als das wirksamste Zytostatikum heraus, welches auch dem Einsatz von 5-Fluorouracil weit überlegen war. Es zeigte bei alleiniger Gabe bereits in 80% (XTT) bzw. 93% (KV) eine gute zytotoxische Wirkung. Hier ist eine Umgehung der „Multi drug Resistance“ zu diskutieren. Andere Mechanismen werden diskutiert, da mit Hemmung des MDR-1-Gens durch Gabe von

Verapamil und/oder Glutathionsulfoximinine keine signifikante Verbesserung des Ansprechens auf die Zytostatikagabe erreicht wurde (Mickisch et al. 1990).

Doxorubicin bewirkt wahrscheinlich durch zusätzliche Wirkung an Membranen eine direkte Zerstörung der Zellen, daher führt die Inkubation der Tumorzellen zu einer messbaren Induktion von Apoptose bei unseren in-vitro-Versuchen.

Die Behandlung mit 5-Fluorouracil führte ebenfalls nachweislich bei 50% der Zelllinien zu einem messbaren zytotoxischen Effekt, obgleich dieser deutlich geringer war im Vergleich zur Doxorubinbehandlung. Durch die Wirkung von 5-Fluorouracil auf die DNS-Synthese im Rahmen der Zellteilung ist der geringere Effekt durch die eher schwache Proliferation der kultivierten Tumorzelllinien erklärbar, so dass hier eine längere Inkubationszeit möglicherweise eine stärkere Wirksamkeit erbringen würde (Steiner et al. 2001).

Aufgrund seiner, dem 5-Fluorouracil ähnlichen Wirkmechanismen untersuchten wir die Nierenzellkarzinome auch mit Gemcitabin. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Hernandez-Vargaz mit Gemcitabin an Mammakarzinomzellen zeigten eine deutlich erhöhte Basalrate und aktiviertes NF- κ B bei mit Gemcitabin behandelten Zellen (Hernandez-Vargas et al. 2006). Dies unterstreicht die geringen Ansprechraten der von uns untersuchten Nierenzellkarzinome. Ein Durchbrechen der Resistenz durch die Gabe der NF- κ B-Inhibitoren scheint jedoch nicht möglich zu sein.

Ein wichtiges Zytokin bei der Aktivierung von NF- κ B ist TNF- α . Da TNF- α über weitere Signaltransduktionswege verfügt, wovon der über FADD Apoptose induziert, sind weitere Einwirkungen notwendig, um einen signifikanten Effekt durch TNF- α zu erzeugen.

Verschiedene Arbeitsgruppen hatten bereits belegt, dass bei Rel A- negativen Zellen die Überlebenschancen unter Zugabe von TNF- α signifikant schlechter waren als bei Rel A- positiven Zellen (Beg und Baltimore 1996). Dies führte zu der Überlegung, dass eine Kombination von NF- κ B-Inhibitoren und TNF- α zu einem deutlich vermehrten Zellsterben gegenüber der Gabe von Einzelsubstanzen führen müsste. Die geringe Zytotoxizität bei der alleinigen Gabe von TNF- α von 8% im XTT versus 0% in der Kristallviolett-färbung lässt sich durch den antiapoptotischen Effekt des TNF- α -induzierten, aktiven NF- κ B erklären.

Die zusätzliche Gabe von IFN- α , welches die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B hemmt, führt in den Zelllinien zu einer Reduktion des antiapoptotischen Effekts in ca. 30% der untersuchten Zelllinien.

Die Vorbehandlung mit BAY geht in fast allen Fällen mit einer starken Senkung des Stoffwechselumsatzes und auch der Proteinmenge einher. Für diese deutlich stärkere Wirkung kann verantwortlich gemacht werden, dass neben der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung auch die nukleäre Translokation von NF- κ B gehemmt wird und die I κ B-Stabilisierung irreversibel ist.

Die alleinige Gabe der Inhibitoren hat allerdings in fast allen Fällen einen größeren bzw. gleichen Effekt wie die Kombination der Inhibitoren mit TNF- α . Sowohl IFN- α als auch BAY und PDTC hemmen die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung, zumindest IFN- α weist jedoch nur begrenzte direkte antitumorale Wirkungen auf. Nach Ausschluss des antiapoptotisch wirkenden Signaltransduktionsweges ist nun ein Überwiegen des über FADD zur Apoptose führenden Weges möglich.

Effekte der Kombinationen

Zum besseren Verständnis der Effekte der Substanzen wurden die Ergebnisse zusätzlich dahingehend bewertet, welchen Einfluss die Kombination zweier Substanzen bezüglich der Wirkung beider Einzelsubstanzen hat, d.h. dass die Interaktionen der verschiedenen Einzelsubstanzen in der Kombination genauer beleuchtet wurden.

Es ergeben sich verschiedene Möglichkeiten von Interaktionen zweier Substanzen. Da unsere Untersuchungen das Ziel verfolgen, mit einer Mono- oder auch Kombinationstherapie möglichst viele Tumorzellen zu eliminieren, sind Effekte, die eine Reduktion der Zellmasse bedingen, hier von besonderem Interesse. Als Ziel ist somit die Reduktion der Zellzahl zu definieren.

Besonders hervorzuheben sind synergistische Wirkungen, bei denen in der Kombination zweier Substanzen ein signifikant höherer Effekt als unter Inkubation mit Einzelsubstanzen erreicht wird (additiver oder auch potenzierender Effekt) siehe Abbildung 9. Die Abbildungen 19 und 20 demonstrieren beispielhaft mögliche Auswirkungen unterschiedlicher Kombinationen.

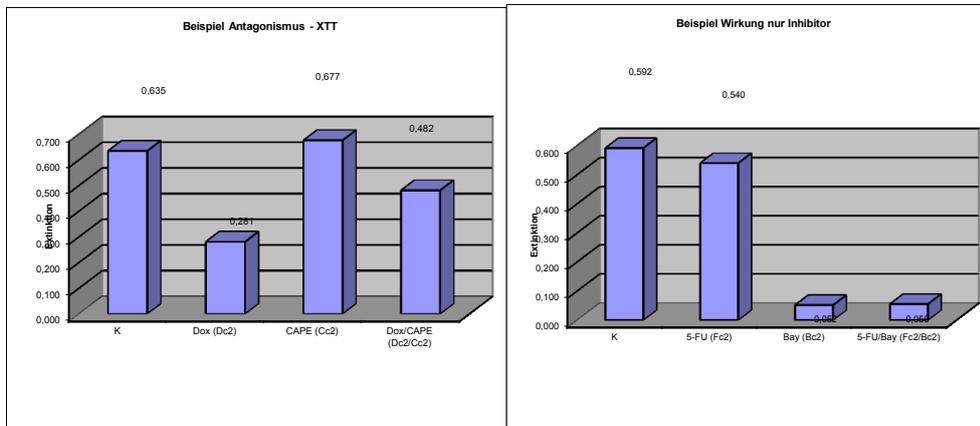


Abb. 19 und 20: Beispiel für Antagonismus (Abb. 19) bzw. Wirkung nur einer Einzelsubstanz (Abb. 20)

Im Rahmen der antagonistischen Interaktion zweier Substanzen hemmen sich die Einzelsubstanzen gegenseitig in ihrer Wirkung, so dass der Effekt der Kombination geringer ist als der Effekt der Einzelsubstanzen. Im Beispiel in Abb. 19 ist die Extinktion der Kombination deutlich höher als die Extinktion von Doxorubicin allein, dies bedeutet eine geringere Reduktion der Zellzahl in der Kombination, so dass der Effekt des Doxorubicin antagonisiert wird.

Die dritte Möglichkeit der Interaktion besteht darin, dass keine Interaktion zwischen den Substanzen nachweisbar ist und jede Substanz unabhängig von der anderen wirkt. Dieser „Effektsummation“ genannte Interaktionstyp ist in unseren Untersuchungen nicht von der synergistischen Interaktion zu unterscheiden.

Eine weitere Rolle spielt die Möglichkeit, dass nur eine Substanz einen Effekt auf die Zellen hat und die andere Substanz keine Wirkung zeigt. Hierbei ist das Überleben der Zellen in der Kombination so groß wie das Überleben der Zellen, die nur mit einer der beiden Substanzen behandelt wurde. In unseren Untersuchungen ergaben sich die Möglichkeiten, dass nur das Zytostatikum bzw. nur der Inhibitor zu einer Reduktion der Zellen führte. Eine Interaktion der Substanzen in der Kombination ist hierbei nicht anzunehmen bzw. nicht sicher nachweisbar. Abbildung 20 zeigt eine mit der Kontrolle nahezu identische Extinktion für 5-Fluorouracil und eine dramatisch niedrigere Extinktion für BAY sowie die Kombination von BAY und 5-Fluorouracil.

Ein besonderer Reaktionstyp ist die Proliferation der Zellen, die nicht unbedingt durch eine Interaktion zweier Substanzen bedingt ist (jedoch einen Extremfall der antagonistischen Interaktion darstellen kann), sondern auch nach Gabe einer einzelnen Substanz möglich ist.

Kommentar [MSOffice11]: Nochmal geändert, aber vielleicht doch eher Müll?

Kommentar [n12]: Das ist doch die klassische Form eines additiven Effektes. Wenn in der Kombination die Zellzahl besser reduziert wird als durch die jeweiligen Einzelsubstanzen heißt das doch noch lange nicht, dass der Wirkmechanismus ineinander greift. Du hast doch keine Wirkmechanismen untersucht, sondern nur das "Endergebnis" erfasst.

Die Besonderheit besteht darin, dass für die Untersuchungen Substanzen ausgewählt wurden, von denen aufgrund ihrer bisher bekannten Wirkmechanismen eine Reduktion der Zellen erwartet wird. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 21 dargestellt.

Außerdem ist es möglich, dass keine der beiden eingesetzten Substanzen eine Wirkung auf die untersuchten Zellen hat, wie in Abbildung 22 gezeigt wird.

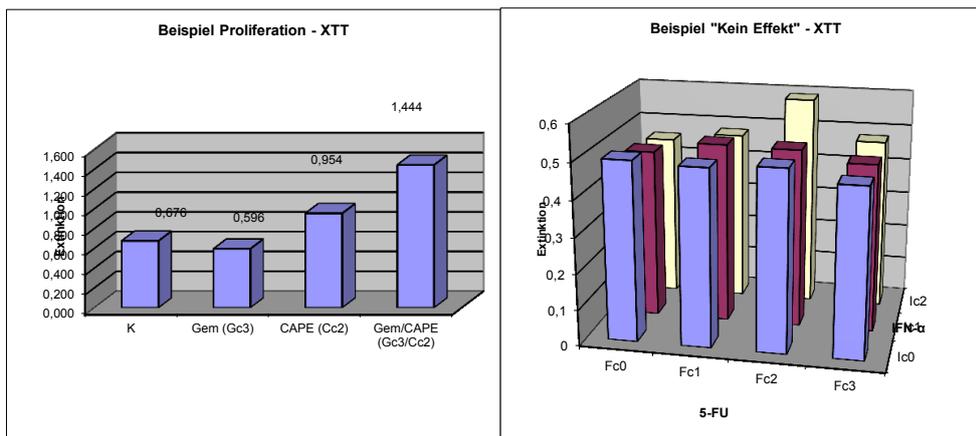


Abb. 21 und 22: Beispiel für Proliferation (Abb. 21) bzw. keinen Effekt (Abb. 22)

Die Einordnung unserer Versuche in die verschiedenen Interaktionstypen zeigte, dass es zwischen einigen der untersuchten Substanzen zu einer synergistischen Wirkung gekommen ist. Da das Ziel verfolgt wurde, durch eine Behandlung mit NF-kB-Inhibitoren die Zellen angreifbarer für Zytostatika zu machen, geben synergistische Interaktionen zwischen den Substanzen einen Hinweis darauf, dass dies bei einigen Zellen zutrifft. Beispielhaft sind die Interaktionen zwischen den NF-kB-Inhibitoren und Doxorubicin sowie 5-Fluorouracil in den Abbildungen 23 und 24 dargestellt.

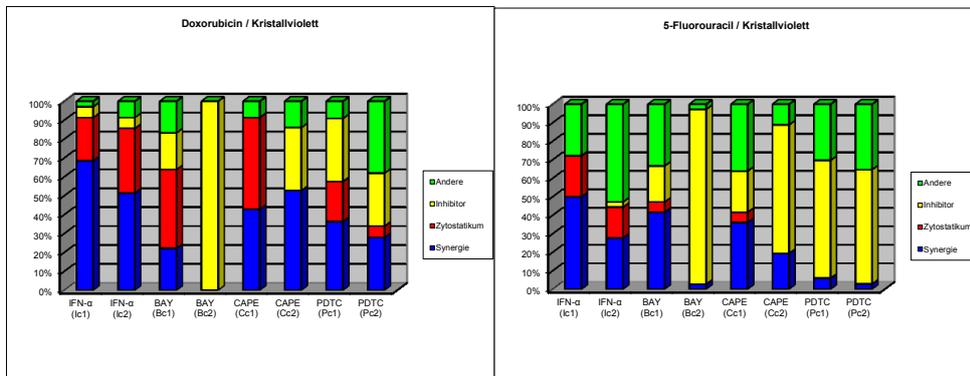


Abb. 23 und 24: Effekte der Inhibitoren und Doxorubicin bzw. 5-Fluorouracil

Die synergistischen Wirkungen aller Zelllinien in den einzelnen Kombinationen sind blau dargestellt. Insbesondere die Kombination IFN- α und Doxorubicin zeigt in mehr als 60% der untersuchten Zelllinien eine Wirkungsverstärkung des zytostatischen Effektes durch IFN- α . Die Kombination mit BAY in hoher Dosierung (Bc₂) wiederum zeigt hier eindrucksvoll die starke Wirkung des Inhibitors.

Auch für die Kombination mit 5-Fluorouracil kann IFN- α als Wirkungsverstärker gesehen werden, ebenso wie BAY und CAPE in niedriger Dosierung (Bc₁ und Cc₁). Für die Kombinationen mit Gemcitabin bzw. das Zytokin TNF- α (Daten nicht dargestellt) waren nur einzelne synergistische Wirkungen nachweisbar.

Die Nachweismethoden

Aufgrund der zum Teil deutlichen Unterschiede der Ergebnisse in den beiden durchgeführten Messmethoden sind diese hinsichtlich ihrer Wirkweisen und möglichen Schwachstellen kritisch zu bewerten.

Eine nicht auszuschließende Fehlerquelle im Rahmen der Untersuchung mittels XTT stellt die mögliche Restaktivität der Lactatdehydrogenase in Mitochondrien apoptotischer Zellen dar, woraus falsch hohe Stoffwechselumsätze resultieren würden.

Andererseits fanden Vistica und Kollegen in verschiedenen Untersuchungen mit verschiedenen Tumorzelllinien eine starke Abhängigkeit von der genutzten Konzentration des XTT, der Zelldichte, des Glukosegehaltes und dem Alter der Kulturen zum Zeitpunkt des Assays heraus. Auch eine Alkalisierung, welche unter Umständen im Rahmen der Aussaat der Zellen oder während der Behandlung mit den Inhibitoren oder Zytostatika

sowie zum Zeitpunkt des Assays erfolgt, kann eine gelegentliche Formation in kristallines Material bedingen, was dann zu unberechenbaren Absorptionsmessungen führt. Zudem wurden die Untersuchungen bei Vistica ausschließlich an permanenten Zellkulturen durchgeführt (Vistica et al. 1991).

Durch den Versuchsansatz wurden Fehlerquellen wie ungenügende Nahrungszufuhr (durch Zugabe von glukosehaltigem Medium bei für ihren extensiven Kohlenhydratmetabolismus bekannten Nierenzellkarzinomlinien), Zelldichte, gleiches Alter der Zellen der verschiedenen Ansätze durch entsprechende Durchmischung vor der Aussaat und den gleichzeitigen Ansatz des Assays aller Kombinationen eines Versuchsansatzes (entsprechend einer untersuchten Tumorzelllinie) weitgehend ausgeschlossen.

Die Verwendung der Kristallviolett-Farbreaktion ist gut geeignet bei hinreichenden Zellzahlen. Eine mögliche Fehlerquelle stellt jedoch die Ablösung von Zellen bei der Fixation dar. Im Gegensatz zur Stoffwechselumsatzmessung mittels XTT (wie oben beschrieben) gehen bei dieser Färbemethode selektiv apoptotische Zellen durch die wiederholten Spülvorgänge verloren, da diese Zellen eine runde Form annehmen und zur spontanen Ablösung vom Trägermaterial tendieren. Eine zu starke mechanische Beanspruchung könnte eine zusätzliche Ablösung eigentlich intakter Zellen bzw. von bereits vorgeschädigten, jedoch nicht apoptotischen, Zellen bedingen.

Allerdings scheint diese Messmethode nicht so vielen potentiellen Störfaktoren zu unterliegen wie die Stoffwechselumsatzmessung mittels XTT.

Immunochemotherapie unter Regulierung von NF- κ B durch Transfektion

Eine experimentelle Regulierung der NF- κ B-Aktivierung kann durch die Transfektion von grundlegend aktivem NF- κ B p65 oder einem dominant negativen I κ B erreicht werden. Dies dient der Bestimmung der Rolle des NF- κ B bei der Resistenz gegenüber chemotherapeutischer Apoptoseinduktion.

Bei den untersuchten primären Tumorzelllinien, die mit 5-Fluorouracil, Doxorubicin und Caelyx inkubiert wurden, war eine signifikante Induktion von Apoptose nur für die Inkubation mit Doxorubicin möglich. Vergleicht man die Effekte des liposomalen Doxorubicin Caelyx mit Doxorubicin, so ist Doxorubicin deutlich effektiver. Dies deckt

sich mit klinischen Studien, in denen Caelyx keine antitumorale Wirkung auf Nierenzellkarzinome zeigte (Law et al. 1995).

Die Vorbehandlung der Zellen mit IFN- α und IL-2 zeigte keine Wirkung auf die für Chemotherapie resistenten Zelllinien, erhöhte jedoch die Wirkung an verschiedenen Zelllinien, bei denen die alleinige zytostatische Behandlung eine Apoptose induzierte. Dies impliziert, dass die zytokinvermittelte Zunahme der Apoptose mit der NF- κ B- Aktivität in Zusammenhang steht (Steiner et al. 2001).

Nach Transfektion der Zellen mit dem aktiven p65 erwarteten wir deutlich vitalere transfizierte Zellen durch einen starken Apoptoseschutz bei hoher NF- κ B-Aktivität. Im Vergleich dazu hätten die I κ B-transfizierten Zellen durch eine Hemmung der Aktivierung und entsprechend niedriger NF- κ B-Aktivität zu einer erheblichen Reduktion der Zellzahl führen müssen. Dies war so jedoch nicht zu beobachten. Vielmehr zeigte sich ein fast gleichsinniges Verhalten aller transfizierten Zellen. Der Eingriff an der NF- κ B-Regulierung scheint das Gleichgewicht der Zellen zu stören. Dies wird zusätzlich verdeutlicht durch die scheinbar unterschiedliche Wirkung auf transfizierte und nicht transfizierte Zellen.

Auffällig war die häufig schlechte Transfektionsrate bei den primären Tumorzelllinien, insbesondere im Vergleich zu den deutlich höheren Raten zum Beispiel bei der permanenten Nierenzellkarzinomlinie A498. Diese Versuche wurden bei einer Transfektionsrate von mindestens 3% durchgeführt. Bei verschiedenen Zelllinien konnte trotz mehrfacher Versuche keine ausreichende Zahl transfizierter Zellen erreicht werden. Dies könnte einen zusätzlichen Faktor in der dann nicht mehr zufälligen Auswahl der Zelllinien darstellen, die möglicherweise bestimmte zellstabilisierende Faktoren mit sich bringen, die neben der Transfektionsfähigkeit auch andere Zellvorgänge, wie auch das Ansprechen auf Chemotherapeutika, beeinflussen könnten. Diese These wird gestützt durch die Ergebnisse von Oya und Kollegen (Oya et al. 2003), die in Abhängigkeit der primären Tumorausbreitung (Tumorstadium) unterschiedliche basale NF- κ B-Aktivitäten fanden (je fortgeschrittener der Tumor, umso höher waren die basalen NF- κ B-Level). Somit ist es möglich, dass aufgrund von bestimmten Membraneigenschaften und Stoffwechselfvorgängen die Transfektion z.B. der Zellen mit niedrigem basalen NF- κ B

besser gelang. Außerdem würde dies das gute Ansprechen der Tumorzellen auf die Doxorubicinbehandlung unter Umgehung der „Multi drug Resistance“ erklären.

7 **Schlussfolgerungen**

Die Aktivierung von NF- κ B sowie die erhöhte NF- κ B-Aktivität als Antwort auf proinflammatorische Zytokine scheint einen Resistenzfaktor in der chemotherapeutischen Behandlung von verschiedenen Nierenzellkarzinomen darzustellen. Eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung führt in vielen Fällen zu einer erhöhten Apoptoseinduktion bei primären Nierenzellkarzinomzelllinien, die auf Zytostatika ansprechen.

Von den an primären Nierenzellkarzinomzelllinien untersuchten NF- κ B-Inhibitoren ist dem Inhibitor BAY eine starke Wirkung auf die Zellen nachzuweisen. Da jedoch nicht alle Angriffsmechanismen vollständig bekannt sind, sind weitere, vom NF- κ B unabhängige, Stoffwechselfvorgänge denkbar, die die Zellen in den Zellkulturen möglicherweise direkt schädigen. Ganz anders stellt sich das Kolonkarzinom HT29 dar, bei dem auch in hohen Dosierungen von BAY kein Effekt nachweisbar ist. Hier scheinen ganz andere Wirkmechanismen eine Rolle zu spielen.

Hinsichtlich der untersuchten Zytostatika hatte Doxorubicin den stärksten zellreduktiven Effekt. Neben den Wirkungen an der DNS könnten in unseren in vitro-Untersuchungen die ebenfalls für diese Substanz bekannten Wirkungen an Membranen im Sinne eines direkt toxischen Effektes eine Rolle spielen. Die anderen getesteten Zytostatika waren in den Versuchsansätzen wenig effektiv.

Für die Vorbehandlung der Zellen mit den NF- κ B-Inhibitoren ergibt sich in den meisten Fällen eine weitere Reduktion der Zellzahlen. Da im klinischen Alltag die alleinige Chemotherapie nicht wirksam ist, könnte die Kombination von NF- κ B-Inhibitoren mit Zytostatika die Therapie effektiver machen und würde so eine Eintrittsstelle für Chemotherapeutika in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms darstellen.

Bei Versuchen der biologischen Modulation der NF- κ B-Aktivität ließen sich keine signifikanten Unterschiede nach Transfektion des dominant negativen I κ B-Plasmids oder des aktivierenden p65-Plasmids nachweisen. Ob die Ergebnisse methodisch oder durch eine zu niedrige Transfektionsfrequenz bedingt sind, lässt sich nicht sagen. Unsere Resultate legen jedoch den Schluss nahe, dass auf diesem Wege eine effektive Beeinflussung der Nierenzellkarzinome nicht möglich ist.

Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre die Testung des erfolgversprechendsten der untersuchten NF- κ B-Inhibitoren BAY als Monosubstanz in vivo im Tiermodell. Durch

die Kombination mit NF- κ B-Inhibitoren könnten möglicherweise trotz Resistenz die Zytostatika wieder einen Stellenwert gewinnen.

Der Ansatz über die biologische Beeinflussung des NF- κ B mittels Transfektion scheint nach unseren Ergebnissen nicht zielführend.

Literaturverzeichnis

- Atzpodien J, Kirchner H, Poliwoda H. 1996. Interleukin 2 based ambulatory therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Med Klin*, 91(Suppl 3):38-43.
- Atzpodien J, Royston P, Wandert T, Reitz M; DGCIN-German Cooperative Renal Carcinoma Chemo-Immunotherapy Trials Group. 2003. Metastatic renal carcinoma comprehensive prognostic system. *Br J Cancer*, 88 (3):348-353.
- Baeuerle P, Baltimore D. 1988. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, 242:540-546.
- Baeuerle P, Henkel T. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:141-179.
- Beg A, Baldwin AS Jr. 1993. The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors. *Genes. Dev.*, 7:2064-2070.
- Beg A, Baltimore D. 1996. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science*, 274:782-784.
- Beg A, Ruben SM, Scheinmann RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AJ. 1992. I κ B interacts with the nuclear localization sequence of subunits of NF- κ B: a mechanism of cytoplasmic retention. *Genes. Dev.*, 6:1899-1913.
- Bhimani RS, Troll W, Gruneberger D, Frenkel K. 1993. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 53: 4528-4533.
- Bichler K, Wechsel HW. 1999. The problematic nature of metastasized renal cell carcinoma. *Anticancer Research*, 19:1463-1466.
- Billiau A, Vanderkerckhove F. 1991. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest*, 21:559-73.

- Bono A, Lovisolo JAJ. 1997. Renal cell carcinoma - Diagnosis and treatment: State of the art. *Eur Urol*, 31 (suppl.1):47-55.
- Bours V, Villalobos J, Burd PR, Kelly K, Siebenlist U. 1990. Cloning of a mitogeninducible gene encoding a kB DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell cycle motifs. *Nature*, 348:76-80.
- Braunstein H, Adelman JU. 1966. Histochemical study of enzymic activity of human neoplasms:II. Histogenesis of renal cell carcinoma. *Cancer*, 19:935-938.
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso GU, Siebenlist U. 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kB and its inhibitor IkB-a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90:2532-36.
- Burke TR, Jr., Fresen MR, Mazumder A., Wang J., Carothers AM, Grunberger D., Driscoll J., Kohn K., Pommier Y. 1995. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J. Med. Chem.*, 38:4171-4178.
- Carswell W, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72:3666-3670.
- Chan D, Marshall FF. 1998. Surgery In Advanced And Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cur Op in Urol*, 8:369-373.
- Cherrington J, Mocarski ES. 1989. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the a-promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J. Virol.*, 63:1435-1440.
- Chiao C, Carothers AM, Grunberger D., Solom G., Preston GA, Barrett JC. 1995. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res*, 55:3576-3583.
- Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. 2005. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001425.

- Dealtry G, Naylor MS, Fiers W, Content J. 1987. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon gamma. *J Immunol*, 17:689-693.
- Dobrowsky R, Hannun YA. 1992. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol.Chem.*, 267:5048-51.
- Duyao M, Buckler AJ, Sonenshein GE. 1990. Interaction of an NFkB-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:4727-33.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, TARGET study group. 2007. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356:125-34.
- Fan C, Maniatis T. 1991. Generation of p50 subunit of NF-kB by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, 354:395.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, 46:765-81.
- Fischer C. 1999. Äthiologie, Pathogenese und Therapie des Nierenzellkarzinoms. *Radiologie*, 39:343-349.
- Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Va Poppel H, Crawford ED. 2004. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol*, 171:1071-6.
- Franklin JR, Figlin R, Belldgrun A. 1996. Renal Cell Carcinoma: Basic Biology And Clinical Behavior. *Semin Urol Oncol*, 14/4:208-215.
- Franzoso G, Bours V, Park S, Tomita YM, Kelly K, Siebenlist U. 1992. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kB-mediated inhibition. *Nature*, 359:339-42.

- Ganchi P, Sun SC, Greene WC, Ballard DW. 1992. I κ B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF- κ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF- κ B p65 DNA binding. *Mol. Cell. Biol.*, 3:1339-1352.
- Godley PA, Ataga KI. 2000. Renal cell carcinoma. *Cur.opin.Oncology*, 12:260-264
- Gokcimen A, Cim A, Tola HT, Bayram D, Kocak A, Ozgüner F, Ayata A. 2007. Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. *Hum Exp Toxicol*, 26:519-25.
- Grem J, van Groeningen CJ, Ismail AA, Johnston PG, Alexander HR, Allegra JC. 1995. The role of interferon alpha as a modulator of fluorouracil and leucovorin. *Eur J Cancer*, 31A:1316-1320.
- Gribaudo G, Ravaglia S, Gaboli M, Gariglio M, Cavallo R, Landolfo S. 1995. Interferon-alpha inhibits the murine cytomegalovirus immediate-early gene expression by downregulating NF- κ B-activity. *Virology*, 211:251-260.
- Grimm S, Baeuerle PA. 1993. The inducible transcription factor NF κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.*, 290:297-308.
- Grunberger D, Banerjee R., Eisinger K., Oltz K., Efros EM, Caldwell M., Estevez V., Nakanishi K. 1988. *Experientia*, 44:230-232.
- Harris DT. 1983. Hormonal therapy and chemotherapy of renal-cell carcinoma. *Semin Oncol*, 10(4):422-30.
- Hartmann JT, Bokemeyer C. 1999. Chemotherapy for Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res*, 19:1541-44.
- Henkel T, Zabel U, van ZK, Müller JM, Fanning E., Baeuerle PA. 1992. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF κ B subunit. *Cell*, 68:1121-33.

- Henzler B, Bichler K-H, Nelde HJ, Frosch I. 1992. Investigations on the heterogeneity of renal cell cancer (RCC) assessed by DNA single-cell cytometry. *Urol*, 147:227A.
- Hermanek P, Schrott KM. 1990. Evaluation of the new tumor, nodes and metastases classification of renal cell carcinoma. *J. Urol*, 144:238-242.
- Hernandez-Vargas H, Rodriguez-Pinilla SM, Julian-Tendero M, Sanchez-Rovira P, Cuevas C, Anton A, Rios MJ, Palacios J, Moreno-Bueno G. 2006. Gene expression profiling of breast cancer cells in response to gemcitabine: NF-kappaB pathway activation as a potential mechanism of resistance. *Breast Cancer Res. Treat.*
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Global ARCC Trial. 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356:2271-81.
- Huguenin P, Kieser S, Glanzmann C, Capaul R, Lutolf UM. 1998. Radiotherapy for metastatic carcinomas of kidney or melanomas: An analysis using palliative endpoints. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 41:401-405.
- Imbert V, Rupec RA, Livolski A., Pahl HL. 1996. Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell*, 86:787-798.
- Jemal A, Murray T, Ward E. 2005. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*, 55:10-30.
- Joffe JK, Patel PM, Banks RE, Selby PJ. 1996. Cytokines in combination with chemotherapy for advanced renal carcinoma--the importance of patient selection. *Cancer Biother Radiopharm*, 11(5):309-13.
- Jones M, Philip T., Palmer P. 1993. The impact of interleukin-2 on survival in renal cancer: a multivariate analysis. *Cancer Biother*, 8:75-288.
- Kawai M, Nishikomori R., Jung EY, Tai G., Yamanaka C., Mayumi M., Heike T. 1995. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits intercellular adhesion molecule-1 biosynthesis induced by cytokines in human fibroblasts. *J Immunol*, 154:2333-2341.

- Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. 1985. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (5): 2028-34.
- Krönke M, Schütze S, Scheurich P, Pfizenmaier K. 1992. TNF signal transduction and TNF responsive genes. In: Aggarwal BB, Vilcek J.: *Tumor necrosis factor, Structure, Function, and Mechanism of Action*. (Marcel Dekker, New York):189-216.
- Kugler A, Stuhler G., Walden P. 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat. Med.*, 6:332-336.
- Larkin J, Eisen T. 2006. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 60 (3):216-226.
- Law TM, Mencil P, Motzer RJ. 1995. Phase II trial of liposomal encapsulated doxorubicin in patients with advanced renal cell carcinoma. *Drugs & Pharmacology*,:
- Leonardo M, Fan CM, Maniatis T, Baltimore D. 1989. The involvement of NF- κ B in β -interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell*, 57:287-94.
- Liou H, Baltimore D. 1993. Regulation of the NF κ B/rel transcription factor and I κ B inhibitor system. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5:477-487.
- Liu S, Ye X., Malik AB. 1999. Inhibition of NF- κ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*, 100:1330-1337.

- Liu ZHH, Goeddel DV, Karin M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. *Cell*, 87:565-576.
- Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC. 2010. EAU Guidelines on renal cell carcinoma: The 2010 update. *European Urology*, 58:398-406.
- Luo JH, Thou FJ, Xie D. 2010. Analysis of long-term survival in patients with localized renal cell carcinoma: laparoscopic versus open radical nephrectomy. *World J Urol*, 28:289-93.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. 2000. IFN-alpha suppresses activation of nuclear transcription factors NF-kappa B and activator protein 1 and potentiates TNF-induced apoptosis. *J Immunol*, 165(9):4927-34.
- Mathias S, Dressler KA, Kolesnick RN. 1991. Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol.Chem.*, 88:10009-13.
- Mc Laughlin JK, Lipworth L. 2000. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncology*, 27:115-123.
- Mercurio F, Didonato J, Rosette C, Karin M. 1992. Molecular cloning and characterization of a novel Rel/NF-kB family member displaying structural and functional homology to NF-kB p50/p105. *DNA Cell Biol*, 11:523-37.
- Mercurio F, DiDonato JA, Rosette C., Karin M. 1993. p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kB mediated signal transduction. *Genes. Dev.*, 7:705-718.
- Meyer R, Hatada H-P, Hohmann HP, Haiker M, Bartsch C, Rötliberger U, Lahm HW, Schlaeger EJ, van Loon APGM, Scheidereit C. 1991. Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kB: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:966-70.

- Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ. 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res*, 59(10):2347-52.
- Mickisch G, Garin A., Madej M. 2000. Tumor nephrectomy plusinterferon alpha is superior to interferon alone in metastatic renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 163:Suppl:176.
- Mickisch GH, Roehrich K, Koessig J, Forster S, Tschada RK, Alken PM. 1990. Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma. *J Urol*, 144(3):755-9.
- Mignogna C, Staibano S, Altieri V, Bufo P. 2006. Prognostic significance of multidrug-resistance protein (MDR-1) in renal clear cell carcinomas: A five year follow-up analysis. *BMC Cancer*, 6:293.
- Mirghomizadeh F, Kupka S, Blin N. 1999. Assessing genetic heterogeneity of renal cell tumors. *Anticancer Research*, 19:1467-1470.
- Motzer RJ, Bukowski RM. 2006. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 24 (35):5601-5608.
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, RECORD-1 Study Group. 2008. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 372:449-56.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P. 2009. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 27:3584-90.

- Murphy D, Farwig K, Detjen K, Welzel M, Riecksen EO, Wiedemann B, Rosewicz S. 1999. Molekulare Mechanismen der antiproliferativen Effekte von Interferon alpha in humanen hepatozellulären Karzinomzellen. *Z Gastroenterol*, 37:919.
- Natarajan K, Singh S, Burke TR, Jr., Grunberger D, Aggarwal BB. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(17):9090-5.
- Naumann M, Wulczyn FG, Scheidereit C. 1993. The NF-kB precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl3 are Ikb molecules and control nuclear translocation of NF-kB. *EMBO J.*, 12:213-222.
- Nolan G, Fujita T, Bhatia K, Huppi K, Liou H-C, Scott ML, Baltimore D. 1993. The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear Ikb-like molecule that preferentially interacts with NF-kB p50 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.*, 13:3557-66.
- Oberling C, Riviere M, Haguenu F. 1960. Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance of the demonstration of their renal origin. *Nature*, 186:402-403.
- Old L. 2008. Cancer vaccines: an overview. *Cancer Immun.*, 8
- Oliveira J, Mukaida N, Matsushima K, Vilcek J. 1994. Transcriptional inhibition of interleukin-8 gene by interferons is mediated by the NF-kB site. *Mol. Cell. Biol.*, 14:5300-5308.
- Oudard S, Levalois C, Andrieu JM, Bourgaran J, Validire P, Thiounn N, Poupon MF, Fourme E, Chevillard S. 2002. Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome. *Anticancer Res*, 22:121-128.

- Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N, Murai M. 2003. Increased nuclear factor kappa B activation is related to the tumor development of RCC. *Carcinogenesis*, 24 (3):377-384.
- Perkins N, Schmid RM, Duckett CS, Leung K, Rice NR, Nabel GJ. 1992. Distinct combinations of NF-kB subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:1875-79.
- Peycelon M, Hupertan V, Comperat E. 2009. Long-term outcomes after nephron sparing surgery for renal cell carcinoma larger than 4 cm. *J urol*, 181:35-41.
- Pierce J, Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore SA, Collins T., Gerritsen ME. 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol.Chem.*, 272:21096-21103.
- Pyrhönen S, Salminen E., Ruutu M. 1999. Prospective randomized trial of interferon alpha-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.*, 17:2859-2867.
- Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Redy BS. 1992. Effect of caffeic acid ester on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem Biol Interact*, 84 (3): 277-90.
- Rath PC, Aggarwal BB. 2001. Antiproliferative effects of IFN-alpha correlate with the downregulation of nuclear factor-kappa B in human Burkitt lymphoma Daudi cells. *J Interferon Cytokine Res*, 21(7):523-8.
- Rice N, MacKichan ML, Israel A.,. 1992. The precursor of NF-kB p50 has I κ B-like functions. *Cell*, 71:243-253.
- Rhode D, De Mulder PHM, Weissbach L, Osieka R, Blatter J, Jakse G. 1996. Experimental and clinical efficacy of Gemcitabine against renal cell carcinoma. *Oncol.*, 53:476-481.

- Rohde D, Hayn HK, Blatter J, Jakse G. 1998. The efficacy of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) combined with interferon in human renal cell carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 12:1361-1366.
- Rosenberg S, Lotze MT, Muul LM. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.*, 316:889-897.
- Scheinmann R, Beg AA, Baldwin AS. 1993. NF- κ B p100 (Lyt-10) is a component of H2TF1 and can function as an I κ B-like molecule. *Mol. Cell. Biol.*, 13:6089-6101.
- Schlichter A, Wunderlich H, Junker K, Kosmehl H, Schubert J. 1999. Grenzen der partiellen Nephrektomie beim Nierenzellkarzinom. *Urologe A*,:479-485.
- Schreck R, Meier B., Mannel DN, Droge W., Baeuerle PA. 1992. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.*, 175:1181-1194.
- Schubert J. 2000. Nierenzellkarzinom – Bewährtes und Neues: Therapie metastasierter Tumoren. Pressekonferenz der DGU (Deutsche Gesellschaft für Urologie) Düsseldorf
- Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generations. *J. Biol.Chem.*, 267:5317-5323.
- Schumacher K.2000. Therapie maligner Tumoren. Stuttgart. Schattauer Verlag.
- Scott M, Fujita T., Liou HC, Nolan GP, Baltimore D. 1993. The p65 subunit of NF- κ B regulates I κ B by two distinct mechanisms. *Genes. Dev.*, 7:1266-1276.
- Seljelid R, Ericsson JLE. 1965. Electron microscopic observations on specializations of the cell surface in renal clear cell carcinoma. *Lab. Invest.*, 14:435-447.

- Sherman M, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM, Ignarro LJ. 1993. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191:1301-1308.
- Singh S, Aggarwal BB. 1995. Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem*, 270(18):10631-10639.
- Steiner T, Junker U, Henzgen B, Nuske K, Durum SK, Schubert J. 2001. Interferon-Alpha Suppresses the Antiapoptotic Effect of NF-kB and Sensitizes Renal Cell Carcinoma Cells in vitro to Chemotherapeutic Drugs. *Eur Urol*, 39(4):478-83.
- Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, et al. 2010. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*, 28: 1061-8.
- Suffys P, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W. 1987. Reduced Tumor necrosis factor- induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149:735-743.
- Sunil Y, Ramadori G, Raddatz D. 2010. Influence of NFkappaB inhibitors on IL-1beta-induced chemokine CXCL8 and -10 expression levels in intestinal epithelial cell lines: glucocorticoid ineffectiveness and paradoxical effect of PDTC. *Int J Colorectal Dis*, 3:323-33.
- Sun S, Ganchi PA, Ballard W., Greene WC. 1993. NF-kB controls expression of inhibitor IkbA: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259:1912.
- Tallberg T, Tykkä H., Mahlberg K. 1985. Active specific immunotherapy with supportive measures in the treatment of palliatively nephrectomized renal adenocarcinoma patients. *Eur Urol*, 11:233-243.

- Tannenbaum M. 1971. Ultrastructural pathology of human renal cell tumors. *Pathol. Annu.*, 6:259.
- Ten R, Blank V, Le Bail o, Kourilsky P, Israel A. 1993. Two factors, IRF1 and KBF1/NF-kappaB, cooperate during induction of MHC class I gene expression by interferon alpha, beta or Newcastle disease virus. *C R Acad Sci III*, 316:496-501.
- Ten R, Paya CV, Israel N, Le BO, Mattei MG, Virelizier JL, Kourilsky P, Israel A. 1992. The characterization of the promoter of the gene encoding p50 subunit of NF-kB indicates that it participates in its own regulation. *EMBO J.*, 11:195-203.
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. 1986. Histopathology of renal cell tumors (adenomas, oncocyotomas, carcinomas). *Pathol Res Pract*, 181: 125-143.
- Traenckner E, Pahl HL, Henkel T., Schmidt KN, Wilk S., Baeuerle PA. 1995. Phosphorylation of human IkbA on serines 32 and 36 controls IkbA proteolysis and NF-kB activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.*, 14:2876-2883.
- Van Antwerp D, Martin SJ, Kafri T., Green DR, Verma IM. 1996. Suppression of TNF-a-induced apoptosis by NF-kB. *Science*, 274:787-789.
- Vistica DT SP, Scudiero D, Monks A, Pittmann A, Boyd MR. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected Parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, 51:2515 - 2520.
- Wallace A, Nairn RC. 1972. Renal tubular antigens in kidney tumors. *Cancer*, 29:977.
- Wang C, Mayo MW, Baldwin AS,Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-kB. *Science*, 274:784-787.
- Wu M, Lee H., Bellas RE, Schauer SL, Arsura M., Katz D., FitzGerald MJ, Rothenstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE. 1996. Inhibition of NF-kB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.*, 15(17):4682-4690.

- Yang C, Murti A, Pfeffer SR, Kim JG, Donner DB, Pfeffer LM. 1999. IFN activates NF- κ B to promote cell survival through a pathway involving STAT3, PI-3K and Akt. *J Interferon Cytokine Res*, 19 (suppl 1):123.
- Zabel U, Baeuerle PA. 1990. Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell*, 61:255-265.
- Zabel U, Henkel T., dos Santos Silva M., Baeuerle PA. 1993. Nuclear uptake control of NF- κ B by MAD-3, an I κ B protein present in the nucleus. *EMBO J.*, 12:201-211.
- Ziegler-Heitbrock H, Sternsdorf T., Liese J., Belohradsky B., Weber C., Wedel A., Schreck R., Baeuerle P., Strobel M. 1993. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF- κ B mobilization and TNF production in human monocytes. *J. Immunol.*, 151:6986-6993.

Danksagung

Herrn PD Dr. med. T. Steiner gilt mein größter Dank für die Betreuung und Aufarbeitung des Themas, die wissenschaftliche Beratung sowie für die Geduld bei der Anfertigung der Dissertation und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Für die wissenschaftliche Betreuung sowie die wertvollen Ratschläge zu jeder Zeit möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. U. Junker bedanken.

Für die Unterstützung während der experimentellen Arbeiten und die freundliche Anleitung im Labor danke ich Frau K. Nuske.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Instituts für klinische Immunologie, insbesondere Frau B. Fahlbusch und Frau S. Thies für ihre Unterstützung und den Mitarbeitern der Klinik für Urologie für die Bereitstellung der Zellkulturen.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Geduld danken.

Ein ganz lieber Dank gilt meinem Mann und meinen wundervollen Kindern für ihr entgegengebrachtes Verständnis.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Beate Henzgen, geboren am 24.05.1977 in Jena, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir genutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. med. T. Steiner und Herr Dr. med. U. Junker,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Magdala, den 29.05.2012

