

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Funktionelle Charakterisierung von CDK11 im Nierenzellkarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dr. Tjark-Ole Büntemeyer
aus Rotenburg (Wümme)

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

8. Mai 2020

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	10
1. Einleitung	14
2. Literaturdiskussion	15
2.1 Das Nierenzellkarzinom.....	15
2.1.1. Definition	15
2.1.2 Epidemiologie.....	15
2.1.3 Klassifikation des Nierenzellkarzinoms	15
2.1.4 Pathogenese	15
2.1.5 Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms.....	17
2.1.6 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms.....	17
2.1.6.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren	17
2.1.6.2 mTOR-Kinase-Inhibitoren.....	18
2.1.6.3 Monoklonale Antikörper.....	19
Exkurs: ABT-737	19
2.2 Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen und CDK11	20
2.2.1 CDK11 – Aufbau und Funktion.....	21
2.2.1.1 CDK11 _{p110}	22
2.2.1.2 CDK11 _{p58}	22
2.2.1.3 CDK11 _{p46} und CDK11 _{p60}	22
2.2.2 Pathophysiologie von CDK11	25
2.2.2.1 Onkologie	25
2.2.2.2 Nervensystem und HIV.....	26
2.3 Die E2F – Proteinfamilie.....	27
2.3.1 E2F – Struktur und Regulation	27
2.3.2 E2F1 – Funktion.....	28
2.3.3 Pathophysiologie von E2F1 in Tumoren	29
2.3.3.1 E2F1 im Nierenzellkarzinom	29
2.3.3.2 E2F1 in weiteren Tumoren	30

3. Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Zelllinien	32
3.1.2 Kulturmedien und Zusätze.....	32
3.1.3 siRNA-Oligonukleotide.....	32
3.1.4 Chemikalien	33
3.1.5 Geräte	34
3.1.6 Lösungen und Puffer	35
3.1.7 Antikörper.....	36
3.1.8 Verbrauchsgegenstände.....	37
3.1.9 Kits.....	38
3.1.10 Software und Statistik.....	38
3.2 Methoden	39
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	39
3.2.1.1 Zellkultivierung.....	39
3.2.1.2 Kryokonservierung.....	39
3.2.1.3 Zellzahlbestimmung.....	39
3.2.1.4 Transfektion	40
3.2.1.5 Kristallviolettffärbung	40
3.2.2 Biochemische Methoden	41
3.2.2.1 Herstellung von Lysaten	41
3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	41
3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.2.2.4 Western Transfer	43
3.2.2.5 Immunoblot-Analyse.....	43
3.2.2.6 Durchflusszytometrie	44
3.2.2.6.1 Bestimmung der Apoptose-Rate.....	44
3.2.2.6.2 BrdU-Assay.....	45
4. Ergebnisse	47
4.1 Expression von CDK11 im NZK.....	47
4.2 Reduzierte CDK11 Expression im NZK mittels siRNA.....	47
4.3 Einfluss der CDK11 Expression auf das Zellwachstum	48
4.4 Einfluss der CDK11 Expression auf unterschiedliche Signalwege	50
4.5 Einfluss der CDK11 Expression auf die Proliferation	54

4.6 Einfluss der CDK11 Expression auf den zytotoxischen Effekt verschiedener Substanzen	56
4.7 Wirkung von ABT-737 auf NZK Zelllinien mit CDK11 Knockdown	64
4.8 Einfluss der CDK11 Expression auf die Apoptose	67
4.9 Einfluss der CDK11 Expression auf die Autophagie	69
4.10 Einfluss von CDK11 Expression auf den Zellzyklus.....	70
4.11 Reduzierte E2F1 Expression im NZK mittels siRNA	71
4.12 Einfluss der E2F1 Expression auf das Zellwachstum	71
4.13 Einfluss der E2F1 Expression auf unterschiedliche Signalwege	74
4.14 Einfluss der E2F1 Expression auf den zytotoxischen Effekt verschiedener Substanzen	76
4.15 Einfluss der E2F1 Expression auf das pro-apoptische Protein Bim	85
5. Diskussion	86
5.1 Expression von CDK11 im Nierenzellkarzinom	86
5.2 Viabilität in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	86
5.3 Aktivität verschiedener Signalwege nach CDK11 Knockdown	87
5.4 CDK11 Expression und Proliferation	88
5.5 Sensitivierung verschiedener Therapeutika nach CDK11 Knockdown	89
5.6 CDK11 Knockdown und Apoptose.....	91
5.6.1 Annexin-V.....	91
5.6.2 Apoptose-regulierende Proteine.....	92
5.7 CDK11 Expression und E2F1	93
5.8 Viabilität und E2F1 Expression	93
5.9 E2F1 Expression und AKT-Signalweg.....	93
5.10 Sensitivierung verschiedener Therapeutika nach E2F1 Knockdown	94
5.11 E2F1 Knockdown und Apoptose.....	95
5.12 Zusammenhang zwischen CDK11 und E2F1 – eine Hypothese.....	95
6. Zusammenfassung	99
7. Literaturverzeichnis	100
Danksagung	108
Curriculum vitae	109

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CDC2L1	<i>Cell division cycle 2-like 1</i>
CDC2L2	<i>Cell division cycle 2-like 2</i>
CDK(s)	<i>Cyclin-dependent kinase(s)</i>
CDK11	<i>Cyclin-dependent kinase 11</i>
cm	Zentimeter
CRISPR–Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> <i>Cas9</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP1/2	<i>dimerization partner 1/2</i>
DTT	Dithiothreitol
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
ERK1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FBS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IL-2	Interleukin-2
IRES	Internal ribosome entry site
I κ B- α (FL)	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in</i> <i>B-cells inhibitor, alpha</i>
kDa	Kilodalton
KLF6	Krüppel-like factor 6
L	Liter

LC-3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3</i>
M	Molar
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP2	Matrix-Metalloproteinase-2
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NaN ₃	Natriumazid
NZK	Nierenzellkarzinom
p-ERK	<i>phosphorylated extracellular-signal-regulated kinase</i>
p-H2A.X	<i>phosphorylated Histon H2A.X (Ser139)</i>
p-IκB-α (FL)	<i>phosphorylated Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (Ser32/36)</i>
p-p70S6k	<i>phosphorylated p70 ribosomal protein S6 kinase (Thr389)</i>
p-S6	<i>phosphorylated S6 ribosomal protein (Ser240/244)</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
p21	<i>p21 Waf1/Cip1, CDK inhibitor 1</i>
p62	<i>Sequestosome 1, ubiquitin-binding protein p62</i>
p70S6k	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK1	<i>p21 activated kinase 1</i>
PBRM1	Polybromo 1
PDGF-b	<i>platelet-derived growth factor-b</i>
pRb	Retinoblastom-Protein
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
pVHL	von-Hippel Lindau-Protein
RCC	renal cell carcinoma
RFC4	<i>Replication factor C 4</i>
RNAPII	RNA-Polymerase-II
S6	<i>Ribosomal protein S6</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering Ribonucleinsäure</i>
SPOP	Speckle-type POZ protein
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris buffered Saline mit Tween 20</i>

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	transforming growth factor- α
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
u.a.	unter anderem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von-Hippel Lindau-Protein
z.T.	zum Teil
μ L	Mikroliter

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalwege und Angriffspunkte beim Nierenzellkarzinom.....	16
Abbildung 2: Darstellung des mTOR Signalweges	18
Abbildung 3: Synergistische Apoptoseinduktion durch ABT-737 und Chloroquin	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung der CDK11 Proteinkinase	21
Abbildung 5: Zusammenfassung der zellulären Funktionen von CDK11	24
Abbildung 6: Zellzyklusabhängige Regulation von E2F1	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung der gegensätzlichen Funktionen von E2F1 bei VHL Inaktivierung.....	30
Abbildung 8: CDK11 Expression in den NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P.....	47
Abbildung 9: Immunoblot-Analyse des CDK11 Knockdowns	48
Abbildung 10: Auswirkungen der CDK11 Expression auf das Zellwachstum der ACHN Zellen	48
Abbildung 11: Auswirkung der CDK11 Expression auf das Zellwachstum der 786-O Zellen.....	49
Abbildung 12: Auswirkung der CDK11 Expression auf das Zellwachstum der 769-P Zellen.....	50
Abbildung 13: Immunoblot-Analyse der (A) AKT und (B) pAKT Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression	51
Abbildung 14: Immunoblot-Analyse der (A) p70-S6-Kinase und (B) pp70-S6-Kinase Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	52
Abbildung 15: Immunoblot-Analyse der (A) S6-Kinase und (B) pS6-Kinase Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	52
Abbildung 16: Immunoblot-Analyse von (A) ERK1/2 und (B) pERK1/2 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression	53
Abbildung 17: Immunoblot-Analyse von (A) I κ B- α und (B) pI κ B- α Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression	53
Abbildung 18: Einfluss von CDK11 Expression auf die Proliferation der ACHN Zelllinie	54
Abbildung 19: Einfluss von CDK11 Expression auf die Proliferation der 786-O Zelllinie	55

Abbildung 20: Einfluss von CDK11 Expression auf die Proliferation der 769-P Zelllinie.	55
Abbildung 21: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der ACHN Zellen	57
Abbildung 22: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der ACHN Zellen.....	58
Abbildung 23: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der ACHN Zellen.....	59
Abbildung 24: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 786-O Zellen	60
Abbildung 25: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 786-O Zellen.....	60
Abbildung 26: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 786-O Zellen.....	61
Abbildung 27: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 769-P Zellen.....	62
Abbildung 28: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 769-P Zellen	63
Abbildung 29: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 769-P Zellen	63
Abbildung 30: Apoptose-Rate von ACHN nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-737	64
Abbildung 31: Apoptose-Rate von 786-O nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-737.	65
Abbildung 32: Apoptose-Rate von 769-P nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-737.	66
Abbildung 33: Immunoblot-Analyse der (A) Mcl-1, (B) Bcl-xL und (C) Bcl-2 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	67
Abbildung 34: Immunoblot-Analyse der (A) Bim, (B) Bak und (C) Bax Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression	68
Abbildung 35: Immunoblot-Analyse der LC3 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	69
Abbildung 36: Immunoblot-Analyse der p62 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	69
Abbildung 37: Immunoblot-Analyse der p21 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	70
Abbildung 38: Immunoblot-Analyse der E2F1 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.....	70
Abbildung 39: Immunoblot-Analyse des E2F1 Knockdowns	71
Abbildung 40: Auswirkungen der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der ACHN Zellen.....	72
Abbildung 41: Auswirkungen der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der 786-O Zellen.....	73

Abbildung 42: Auswirkungen der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der 769-P Zellen.....	73
Abbildung 43: Immunoblot-Analyse der (A) AKT und (B) pAKT Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression	75
Abbildung 44: Immunoblot-Analyse der (A) p70-S6-Kinase und (B) pp70-S6-Kinase Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression	75
Abbildung 45: Immunoblot-Analyse der (A) S6-Kinase und (B) pS6-Kinase Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression	76
Abbildung 46: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der ACHN Zellen	77
Abbildung 47: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der ACHN Zellen.....	78
Abbildung 48: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der ACHN Zellen.....	78
Abbildung 49: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 786-O Zellen	79
Abbildung 50: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 786-O Zellen.....	80
Abbildung 51: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 786-O Zellen.....	81
Abbildung 52: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 769-P Zellen.....	82
Abbildung 53: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 769-P Zellen	83
Abbildung 54: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 769-P Zellen	84
Abbildung 55: Immunoblot-Analyse der Bim Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung der drei Hauptisoformen von CDK11	23
Tabelle 2: Verwendete Medien und Zusätze	32
Tabelle 3: Verwendete siRNA-Oligonukleotide	32
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	33
Tabelle 5: Verwendete Geräte	34
Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer	35
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper	36
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper	37
Tabelle 9: Benutzte Verbrauchsgegenstände	37
Tabelle 10: P-Werte.....	38
Tabelle 11: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.....	42
Tabelle 12: Zusammenfassung der Substanzen für den KV Assay mit eingesetzter Konzentration	57
Tabelle 13: Zusammenfassung der Apoptose regulierenden Proteine	67

1. Einleitung

Das Nierenzellkarzinom gehört zu den zehn am häufigsten diagnostizierten Tumorarten in Deutschland [1]. Bei Diagnosestellung weisen bis zu 30 % der Patienten Metastasen auf und 40 % der Patienten mit initial lokal begrenzten Tumoren entwickeln im Verlauf der Erkrankung ein Rezidiv [2]. Die systemische Therapie metastasierender Nierenzellkarzinome beinhaltet zielgerichtete Therapeutika wie den anti-VEGF-Inhibitor Bevacizumab, den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib und den mTOR-Inhibitor Temsirolimus [2] [3] [4]. Doch trotz dieser Möglichkeiten bleibt die Prognose in vielen dieser Fälle eingeschränkt.

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen sind in jüngster Zeit Cyclin-abhängige Kinasen in den Fokus gerückt. Verantwortlich für viele zelluläre Prozesse, wie u. a. die Zellzykluskontrolle, spielen sie bei der Onkogenese vieler Tumorarten durch pathologische Veränderung eine entscheidende Rolle [5]. Der Erfolg des CDK4/CDK6-Kinasen-Inhibitors Palbociclib in der Therapie des metastasierten Brustkrebses ist ermutigend und könnte beispielhaft für neuartige Medikamente auch beim metastasierten Nierenkrebs sein [6].

Ähnlich wie Cyclin-abhängigen Kinasen sind auch die Proteine der E2F-Familie in vielen Tumoren durch Mutationen verändert und ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt. Im Speziellen das ubiquitär vorkommende E2F1 ist in diversen Tumoren überexprimiert und fördert den Tumorprogress. Als wichtiger Regulator des Zellzyklus und aufgrund seiner Beteiligung am DNA-Reparatursystem der Zelle kommt ihm entscheidende Bedeutung bei der Zellproliferation zu [7].

Die Bedeutung von CDK11 und E2F1 beim metastasierten Nierenkrebs ist bisher wenig erforscht und soll daher genauer untersucht werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, zunächst jeweils mittels siRNA-Transfektion die Expression von CDK11 und E2F1 zu supprimieren. Anschließend werden funktionelle Analysen zur Bestimmung von Proliferation, Apoptose-Sensitivität und Sensitivität gegenüber verschiedenen Therapeutika durchgeführt, sowie unterschiedliche Signalwege untersucht.

2. Literaturdiskussion

2.1 Das Nierenzellkarzinom

2.1.1. Definition

Das Nierenzellkarzinom (im Folgenden mit „NZK“ abgekürzt) ist ein vom Epithel der proximalen Tubuli ausgehender maligner Tumor der Niere [8].

2.1.2 Epidemiologie

Mit ca. 96 % stellt das NZK den weit überwiegenden Anteil an Nierentumoren beim Erwachsenen in Deutschland [1]. Männer sind im Durchschnitt bei Diagnose 67 Jahre und Frauen 72 Jahre alt [1]. Etwa 4 % der Karzinome treten bei Patienten mit komplexen erblichen Erkrankungen auf, beispielsweise dem von-Hippel-Lindau-Syndrom [1]. Die 5-Jahresüberlebensrate ist bei den in der Mehrzahl der Fälle diagnostizierten Stadien 1 und 2 mit über 85 % als gut einzustufen, nimmt jedoch mit 14 % und einem medianen Überleben von 13 Monaten im Stadium 4 deutlich ab [9] [10].

2.1.3 Klassifikation des Nierenzellkarzinoms

Gemäß WHO-Klassifikation von 2016 gibt es eine Vielzahl an Subtypen des NZK, wovon jedoch nur die meist diagnostizierten an dieser Stelle aufgeführt werden [11]. Mit ca. 80 % stellt das klarzellige NZK den mit Abstand häufigsten Typ dar, gefolgt von dem papillären Karzinom mit etwa 15 % und dem chromophoben NZK mit ca. 5 %, bezogen auf Deutschland [12] [13].

2.1.4 Pathogenese

Sofern nicht anders beschrieben, beziehen sich die Angaben in diesem Abschnitt ausschließlich auf das klarzellige NZK.

In mehr als 70 % der Fälle von NZK liegt eine funktionelle Inaktivierung des von-Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressor-Gens vor [14] [15]. pVHL steuert den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) [16]. Dieser aus 2 Untereinheiten bestehende heterodimere Transkriptionsfaktor induziert die Adaptation des zellulären Metabolismus an hypoxische Bedingungen u. a. durch Bildung von *vascular*

endothelial growth factor (VEGF), *platelet-derived growth factor- β* (PDGF- β) und *transforming growth factor- α* (TGF- α) [16] [17]. Durch pVHL wird insbesondere die HIF-2 α -Konzentration vermindert, was in der Folge durch die reduzierte Synthese der Angiogenesefaktoren tumorsuppressiv wirkt [16] [18]. Die Inaktivierung von pVHL stabilisiert HIF und sorgt damit für eine gesteigerte Produktion von Angiogenesefaktoren (siehe Abbildung 1) [16].

Neben dem VHL-Gen ist in vielen Tumoren die *mammalian target of Rapamycin* (mTOR)-1-Kinase genetisch verändert [19]. Die mTOR Serin/Threoninkinase reguliert die HIF-abhängige Transkription, was die bereits weiter oben beschriebenen Anpassungsprozesse zur Folge hat [20]. Des Weiteren wird mTOR-abhängig über eine Aktivierung des *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) und der S6-Kinase (S6K) die mRNA-Translation und der Progress innerhalb der G1-Phase reguliert [13] [19]. Eine Aktivierung des mTOR Signalweges wird durch PI3-Kinase/AKT Signalweg gesteuert, kann jedoch zusätzlich durch den Tumorsuppressor PTEN inhibiert werden [21].

Insgesamt unterliegen viele Nierenzellkarzinome jedoch einer großen intratumoralen Heterogenität in Bezug auf Mutationen und chromosomale Veränderungen wie z. B. auch PBRM1 [22].

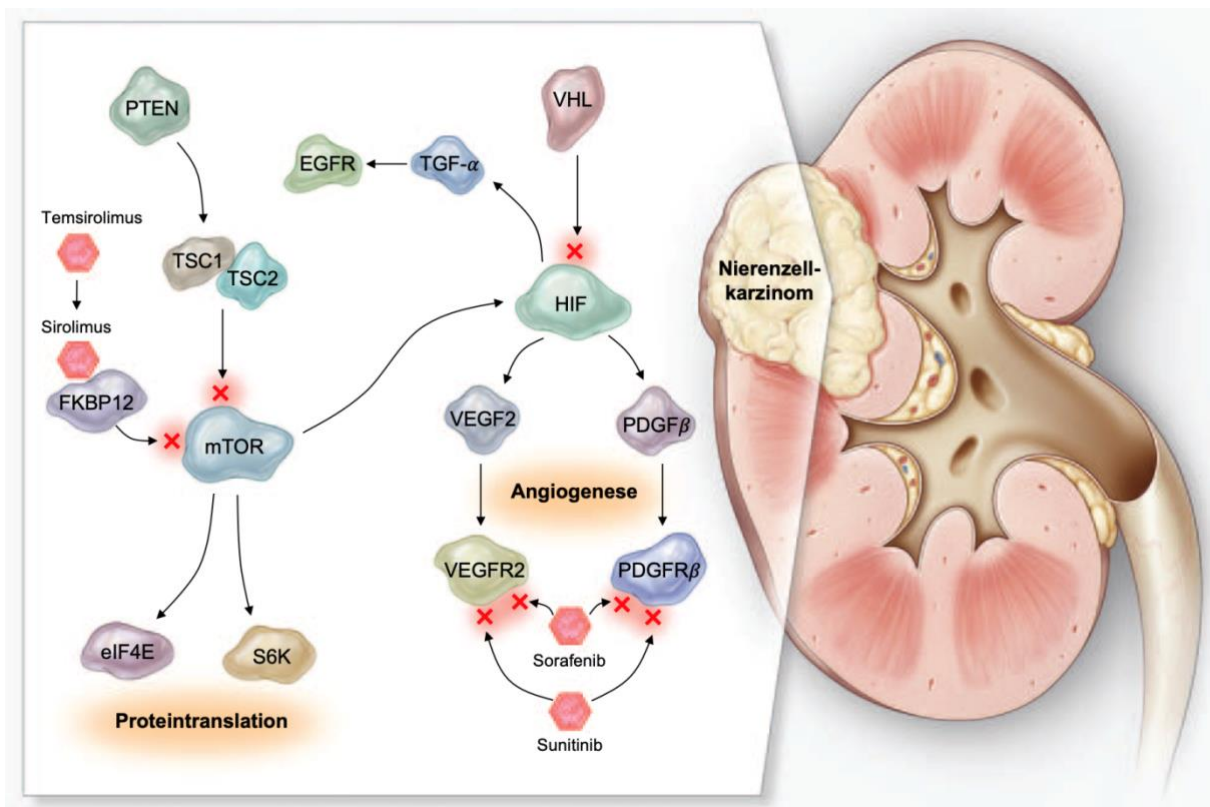


Abbildung 1: Signalwege und Angriffspunkte beim Nierenzellkarzinom [13]

2.1.5 Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms

Die chirurgische Entfernung im Sinne einer partiellen oder radikalen Nephrektomie stellt die einzig kurative Therapieform dar und ist daher der Goldstandard, sofern präoperativ eine R0-Resektion möglich erscheint [9].

2.1.6 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms umfasst insgesamt über ein Dutzend Medikamente, die in Abhängigkeit vom individuellen Risikoprofil und weiteren klinischen Faktoren des Patienten leitliniengerecht zum Einsatz kommen [9] [23] [11]. Bis vor wenigen Jahren wurden routinemäßig die Zytokine Interferon- α und Interleukin-2 eingesetzt, welche jedoch zunehmend durch die neueren Substanzen verdrängt wurden und heutzutage kaum noch klinische Anwendung finden [9] [24] [25].

Die Therapeutika des Nierenzellkarzinoms umfassen im Wesentlichen die Tyrosinkinase-Inhibitoren, die mTOR-Kinase-Inhibitoren, sowie monoklonale Antikörper.

2.1.6.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Mit den zwei Therapeutika Sunitinib und Sorafenib wurde im Jahr 2006 die Klasse der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) in der Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierten Nierenzellkarzinoms eingeführt. Die Medikamente konnten das progressionsfreie Überleben jeweils signifikant verlängern, was jedoch in einigen Fällen mit schweren Nebenwirkungen verbunden war [2] [26]. Die Wirkung wird durch Blockierung des VEGF-Rezeptors 2 durch die genannten Kinase-Inhibitoren erreicht.

Bei guter Ansprechrate verbesserte auch der TKI Pazopanib das progressionsfreie Überleben in einer Phase-III-Studie signifikant gegenüber Placebothherapie [27]. In einer Vergleichsstudie mit Sunitinib und Pazopanib zeigte sich bei Nichtunterlegenheit von Pazopanib in Bezug auf das progressionsfreie Überleben eine insgesamt bessere Verträglichkeit [28].

Der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Cabozantinib, welcher zusätzlich gegen die beiden Onkoproteine MET und AXL gerichtet ist, zeigte gegenüber Sunitinib ein verlängertes

progressionsfreies Überleben bei gesteigerter Ansprechrate in der Erstlinientherapie [29].

Ein weiterer TKI gegen VEGF, Lenvatinib, zeigte in einer Kombinationstherapie zusammen mit Everolimus eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens in der Zweitlinientherapie [30]. In der METEOR-Studie zeigte sich beim Vergleich vom bereits oben erwähnten Cabozantinib gegenüber Everolimus ein verlängertes Gesamtüberleben, sowie progressionsfreies Überleben bei verbesserter Ansprechrate [31]. Angesichts der Resultate wird erwogen, Cabozantinib als neuen Standard zur Zweitlinientherapie festzulegen [31].

2.1.6.2 mTOR-Kinase-Inhibitoren

Temsirolimus stellt den ersten Vertreter aus der Gruppe der zielgerichteten Therapeutika dar, der in der *first-line* Therapie einen signifikanten Überlebensvorteil bei Patienten mit metastasiertem NZK zeigte [21]. Über die Bindung und Komplexierung mit dem intrazellulär vorhandenen Protein FKBP-12 wird der mTOR Signalweg inhibiert, was in verminderter Zellproliferation und reduzierter Angiogenese resultiert (vergleiche Abbildung 2) [32].

Die Wirkungsweise des oral applizierbaren Kinase-Inhibitors Everolimus, einem Rapamycin-Derivat, entspricht der des Temsirolimus und zeigte in einer Placebo-kontrollierten Studie ein verlängertes progressionsfreies Überleben in der *second-line* Therapie [25].

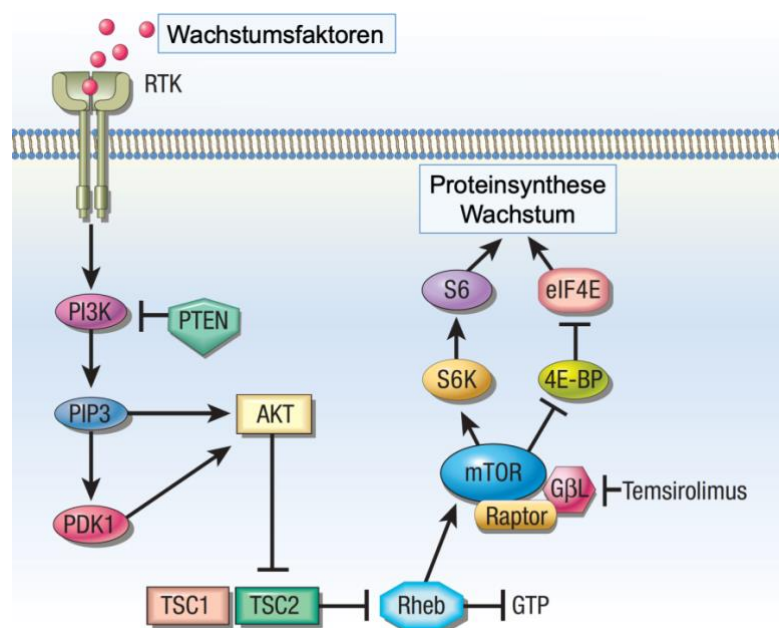


Abbildung 2: Darstellung des mTOR Signalweges [21]

2.1.6.3 Monoklonale Antikörper

Aus dem Zusammenhang zwischen VEGF und dem Tumorprogress im NZK ergab sich früh der Gedanke dies mittels Antikörpern therapeutisch zu nutzen. Die Gabe des anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab bewirkte eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens im Fall des metastasierten Nierenzellkarzinoms [3].

Der PD-1-Inhibitor Nivolumab, aus der Gruppe der Checkpoint-Inhibitoren, zeigte im Vergleich zu Everolimus ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei gleichzeitig verminderter Nebenwirkungsrate in der *second-line* Therapie [33]. Hintergrund ist eine Blockierung der immunsuppressiven Interaktion zwischen dem auf T-Zellen exprimierten PD-1 einerseits und PD-L1 sowie PD-L2 andererseits, welche sich u.a. auf der Oberfläche von Tumorzellen befinden [33].

Die Kombinationstherapie von Nivolumab und Ipilimumab, einem Antikörper gegen *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4), zeigte ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zur Sunitinib-Monotherapie bei zuvor unbehandelten Patienten [23]. Dies bedeutete einen völlig neuen Ansatz durch zwei Medikamente aus dem Bereich der Immunonkologie, welche synergistisch wirken. Auch die Kombinationstherapie aus dem PD-L1 Antikörper Avelumab und dem TKI Axitinib bewirkt gegenüber der Sunitinib-Monotherapie im Rahmen der Erstlinientherapie ein verlängertes progressionsfreies Überleben [34]. Rini *et al.* berichteten über eine ähnliche Studie, wobei die Kombinationstherapie vom PD-1-Inhibitor Pembrolizumab und Axitinib sowohl das progressionsfreie-, als auch das Gesamtüberleben bei verbessertem Ansprechen im Vergleich zu Sunitinib-Monotherapie verlängern konnten [35].

Exkurs: ABT-737

An dieser Stelle ist mit ABT-737 eine Substanz aufgeführt, welche klinisch an Patienten mit NZK noch nicht getestet wurde, die jedoch *in vitro* pro-apoptotische Wirkung entfaltet und im Rahmen dieser Dissertation in therapeutischer Funktion verwendet wird [36] [37] [38].

ABT-737, ein Bcl-2/Bcl-xL-Inhibitor, steigert die Wirkung eines PI3K-Inhibitors und bewirkt eine erhöhte Apoptoserate in den NZK Zelllinien 786-O und 769-P [39]. Dies ging einher mit einer reduzierten Mcl-1- sowie erhöhten Bim-Konzentration (zur Beschreibung dieser Proteine s. „Material und Methoden“). Dabei scheint eine erhöhte Expression von Mcl-1 die Wirkung von ABT-737 zu inhibieren [38]. Durch

Cafestol, ein Bestandteil von Kaffeebohnen, kann die Mcl-1 Expression wiederum inhibiert werden. Eine Kombinationsbehandlung von Cafestol und ABT-737 mündet in Konsequenz in einer erhöhten Expression von Bim [38]. Synergistische Effekte einer Kombinationsbehandlung wurden auch im Fall von ABT-737 mit Chloroquin beschrieben (Abbildung 3), sowie von ABT-737 und dem Survivin-Inhibitor YM155 [37] [36].

Mit ABT-263 (Navitoclax) steht ein oral applizierbarer, weiterer Bcl-2/Bcl-xL-Inhibitor zur therapeutischen Anwendung zur Verfügung [40]. In einer Phase-II-Studie wurde Navitoclax bei Patienten mit rezidiviertem kleinzelligem Lungenkarzinom verabreicht, zeigte jedoch nur begrenzte Wirksamkeit. Möglicherweise könnte es jedoch synergistisch in Kombination mit einer zytotoxischen Therapie wirken [41].

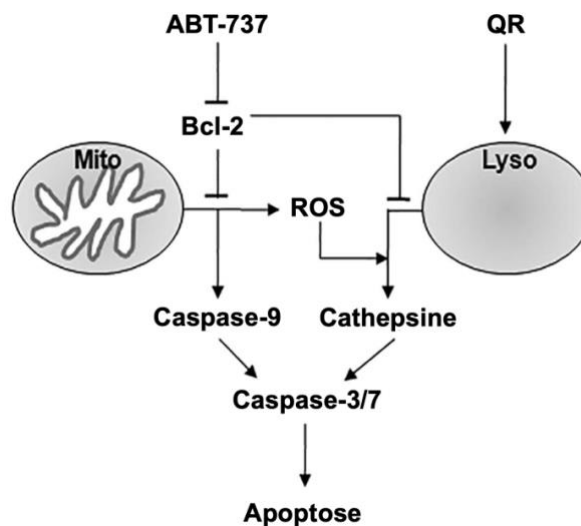


Abbildung 3: Synergistische Apoptoseinduktion durch ABT-737 und Chloroquin (QR) [37]

2.2 Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen und CDK11

Die Erstbeschreibung der Cycline und ihrer funktionellen Partner, den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), erfolgte Anfang der 1980er durch Evans und Beach [42] [43]. Bezeichnend für die Cycline waren deren zellzyklusabhängige Konzentrationsänderungen, wobei in jüngerer Vergangenheit gezeigt wurde, dass dies bei den zuletzt entdeckten Cyclinen z. T. nicht der Fall ist [44]. In Ihrer Funktion als Serin/Threoninkinasen ist die enzymatische Aktivität der CDK abhängig von der Anwesenheit korrespondierender Cycline als weiterer regulatorischer Untereinheit [45]. Die 20 derzeit bekannten CDKs lassen sich weiter unterteilen, je nachdem ob sie mit lediglich einem oder mehreren Cyclinen interagieren [44-46]. Dabei fungieren

solche CDKs die mehrere Cycline binden als Regulatoren des Zellzyklus, während diejenigen CDKs, welche nur ein spezifisches Cyclin binden, durch Phosphorylierung Einfluss auf die Transkription nehmen [45].

Daneben sind CDKs in weitere zelluläre Prozesse, wie u.a. der Spermatogenese, epigenetischen Modifikationen oder DNA-Reparaturmechanismen, involviert [44].

2.2.1 CDK11 – Aufbau und Funktion

Codiert wird die Cyclin-abhängige Kinase 11 (CDK11) im Menschen durch die zwei hoch homologen Gene CDC2L1 (CDK11B) und CDC2L2 (CDK11A) auf Chromosom 1 p36.3 [47]. Erstmals wurde CDK11 1990 als 58 kDa großes Protein unter dem Namen PITSLRE beschrieben [48]. Nachdem mit Cyclin L1/L2 zwei regulatorische Untereinheiten entdeckt wurden, erfolgte die Umbenennung von PITSLRE in CDK11 und die Etablierung in die CDK-Superfamilie (vergleiche Abbildung 4) [49] [50].

Durch alternatives Spleißen der transkribierten prä-mRNA können mehr als 20 verschiedene CDK11-Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 50 und 110 kDa entstehen (siehe Tabelle 1) [51, 52]. Die darunter am besten untersuchten sind CDK11_{p110}, CDK11_{p58}, CDK11_{p46} sowie CDK11_{p60}. Die genannten Isoformen unterscheiden sich neben ihrer Genetik auch in ihrer zellulären Funktion, sodass entweder Prozesse der Apoptose (CDK11_{p46} und CDK11_{p60}), der Zellteilung (CDK11_{p58}), oder der Transkription (CDK11_{p110}), betroffen sein können [5]. Das phänotypische Fehlen von CDK11 endet letal, was seine essentielle Rolle bei der embryonalen Entwicklung unterstreicht [53]. In Zusammenschau seiner vielfältigen zellulären Funktionen nimmt CDK11 unter den CDKs eine Sonderstellung ein und wird im Folgenden genauer dargestellt (vergleiche Abbildung 4) [54].

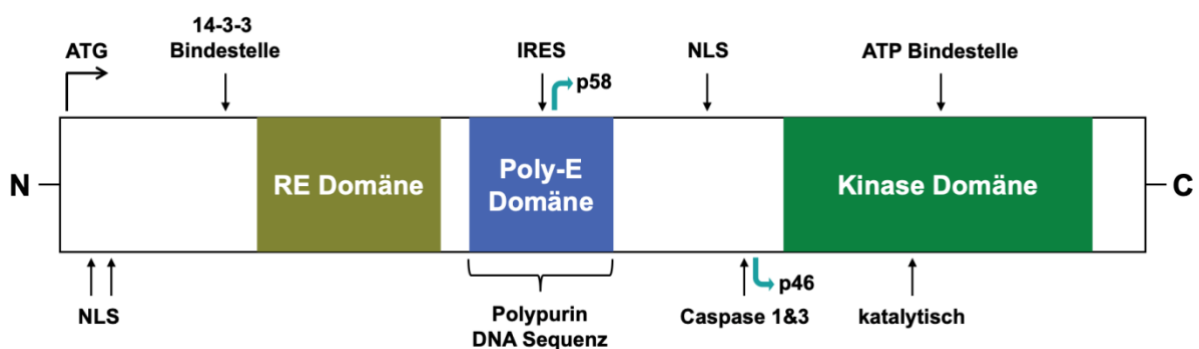


Abbildung 4: Schematische Darstellung der CDK11 Proteinkinase [54]

2.2.1.1 CDK11_{p110}

Die während des kompletten Zellzyklus vorhandene CDK11_{p110} spielt als Bestandteil des RNA-Polymerase-II-Komplexes (RNAPII) eine entscheidende Rolle. Zusammen mit ihren Bindepartnern, den L-Cyclinen, wird sowohl die Transkription als auch das anschließende Spleißen von prä-mRNAs reguliert. [55] [54]. Dies geschieht einerseits über direkte Phosphorylierung des C-terminalen Endes von RNAPII und andererseits über Wechselwirkungen mit den Elongationsfaktoren ELL2, TFIIF, TFIIIS und FACT und den Spleißfaktoren RNA-splicing Faktor 1 RNPS 1 und 9G8 [56] [57] [58]. Die Funktion von CDK11_{p110} bei der RNAPII wurde im Rahmen einer Arbeit über HIV-Replikation nach jahrelanger Kontroverse eindeutig bestätigt [59].

2.2.1.2 CDK11_{p58}

Aufgrund seiner Funktion während der Mitose unterliegt die Konzentration von CDK11_{p58} einer Zellzyklusabhängigkeit, bedingt durch eine interne ribosomale Bindestelle (IRES), mit Auftreten nur in der G2- bzw. M-Phase [60]. Dort ist es an der korrekten Entwicklung des Spindelzellapparates, sowie der Zentrosomenausbildung beteiligt [61] [62]. Aber auch die paarige Anlagerung der Schwesterchromatiden setzt das Vorhandensein von CDK11_{p58} voraus [63]. Sofern in dieser Phase Fehler auftauchen und konsekutiv die regelrechte Mitose betreffen, wird die entsprechende Zelle in die Apoptose geführt. Als zellulärer Schalter kann die p21 aktivierte Kinase 1 (PAK1) gelten, welche je nach Phosphorylierungszustand unmittelbar Einfluss auf die Funktion von CDK11_{p58} nimmt und die Fortsetzung der Mitose inhibieren kann [64]. Dass eine Autophosphorylierung und Dimerisierung von CDK11_{p58} die Grundlage eine regelrechten Funktion der Kinase ist, zeigte Chi im Jahr 2011 [65]. Im Gegensatz zu den anderen Isoformen ist CDK11_{p58} in der Lage, zusätzlich zu den beiden L-Cyclinen noch das Cyclin D3 zu binden [66].

2.2.1.3 CDK11_{p46} und CDK11_{p60}

Durch Caspase 1 und 3 entstehen aus den beiden Isoformen CDK11_{p58} und CDK11_{p110} zwei kleinere Isoformen. CDK11_{p46} beinhaltet als C-terminales Fragment die Kinase-Domäne, während das N-terminale Fragment CDK11_{p60} keine Kinase-Aktivität aufweist [67].

CDK11_{p46} liegt ausschließlich zytoplasmatisch vor und induziert über Zielstrukturen wie z.B. RANBPM und NOT2 die Apoptose [68] [69] [70]. Die CDK11_{p46}-vermittelte

Phosphorylierung der p47-Untereinheit von eIF3f wirkt ebenfalls pro-apoptotisch und ist in diesem Zusammenhang der am detailliertesten untersuchte Signalweg [71]. CDK11_{p60} kann durch Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C pro-apoptotische Wirkung entfalten und die Effekte von CDK11_{p46} dadurch möglicherweise verstärken [72].

Tabelle 1: Charakterisierung der drei Hauptisoformen von CDK11 [54]

Isoform	Masse	Cycline	Lokalisation	Expression	Expression im Krebs	Funktion
CDK11 _{p110}	110 kDa	L1, L2	Zellkern	während des gesamten Zellzyklus	sehr hoch	Transkription RNA Splicing Hedgehog Signalweg Wnt/ β -Catenin
CDK11 _{p58}	58 kDa	L1, L2, D3	Zellkern und Zytoplasma	transient in G2/M Phase	unbekannt	Mitose Zentrosomreifung bipolare Spindelanordnung
CDK11 _{p46}	46 kDa	L1, L2	Zytoplasma	transient	unbekannt	Apoptose Autophagie
CDK11 _{p60}	60 kDa	–	Mitochondrium	transient	unbekannt	Apoptose

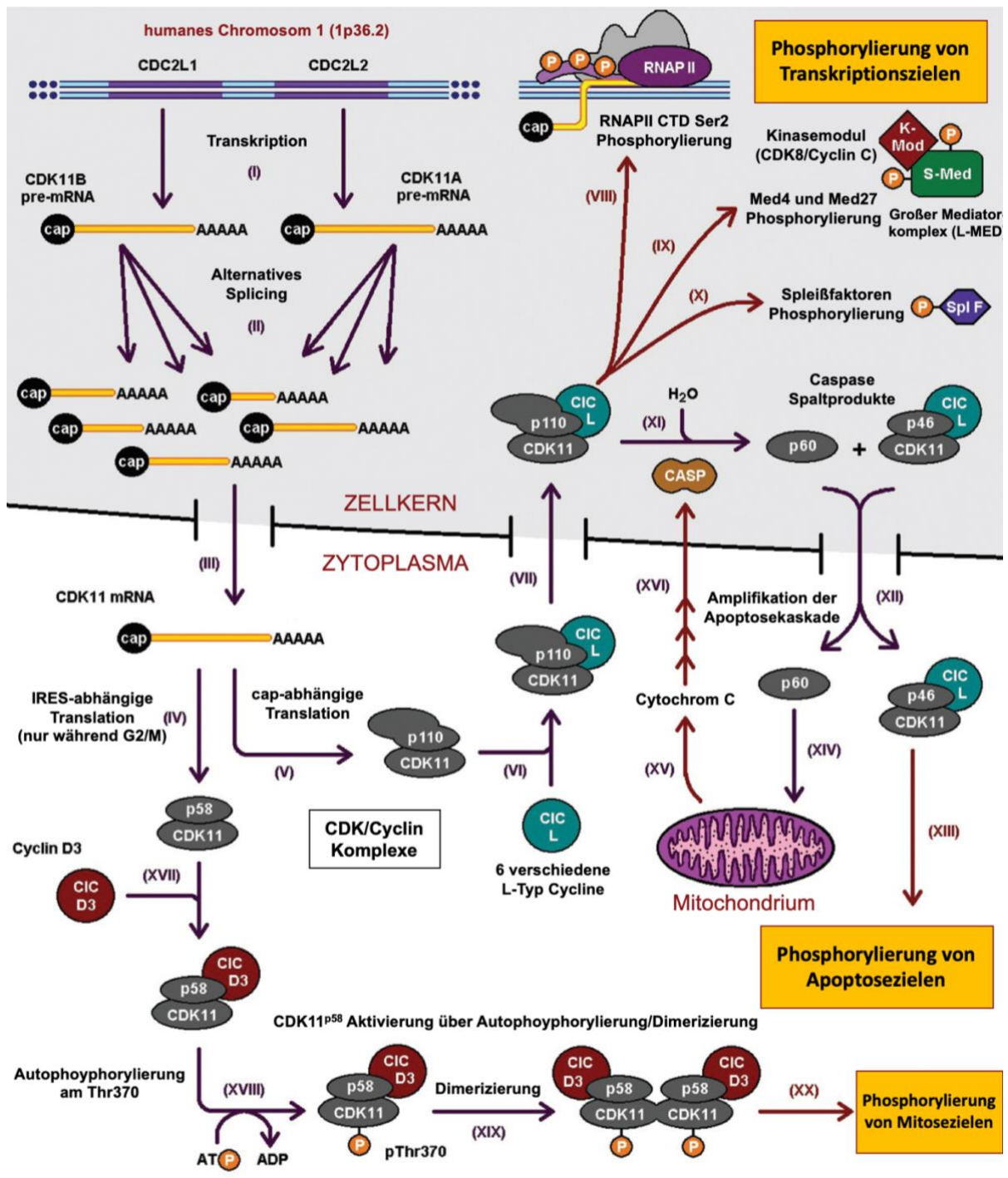


Abbildung 5: Zusammenfassung der zellulären Funktionen von CDK11 [5]

2.2.2 Pathophysiologie von CDK11

2.2.2.1 Onkologie

Veränderte Expressionsmuster von CDKs, Cyclinen und CDK-Inhibitoren können zum Verlust der Zellzykluskontrolle mit der Folge einer potentiell malignen Entartung führen [54]. Die Beteiligung von CDK11 bei der Onkogenese wurde seit vielen Jahren vermutet und gilt mittlerweile als gesichert [73] [74] [75] [76].

Duan *et al.* wiesen in ihrer Arbeit nach, dass die Expression von CDK11 mit der Prognose von Osteosarkom-Patienten korreliert und eine hohe Expression mit einem schlechteren Überleben verknüpft ist [75]. In der Folge wurde durch Nutzung von CRISPR-Cas9 die Expression von CDK11 unterbunden und erkannt, dass sowohl Proliferation und Viabilität reduziert sind, als auch Migration und Invasion der Zellen inhibiert wurden [77]. Ursächlich dafür ist möglicherweise der Androgen-Rezeptor, welcher über die CDK11-Expression reguliert zu sein scheint und daher als möglicher prognostischer Marker in Betracht kommt [78].

Ähnliche Beobachtungen wurden bei Liposarkom Zelllinien gemacht, in denen eine siRNA-induzierte Repression von CDK11 mit einer verminderten Proliferation und gleichzeitig erhöhten Apoptose-Sensitivität einherging. Daneben wurden die zytotoxischen Effekte einer Doxorubicin-Therapie durch die Reduktion der CDK11-Expression gesteigert [79]. Eine erhöhte Apoptose-Induktion und verminderte Proliferation, bedingt durch einen G1-Arrest, wurde auch in Brustkrebs Zelllinien nach siRNA-Repression von CDK11_{p110} bestätigt [50] [80].

Bei der Untersuchung von Patientinnen mit metastasiertem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom fiel auf, dass die CDK11-Expressionsspiegel in den Metastasen und den Rezidivtumoren im Vergleich zum jeweils entsprechenden Primarius deutlich erhöht waren. Auch in dieser Arbeit wurde eine verminderte Proliferation, sowie ein verbessertes Ansprechen auf die durchgeführte Paclitaxel-Therapie festgestellt [81].

In der jüngst von Du *et al.* erschienenen Untersuchung wurde ebenfalls eine verminderte Proliferation bedingt durch einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase bei Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus nach einer siRNA-induzierten Verminderung der CDK11_{p110}-Expression beschrieben [76].

Als therapeutische Zielstruktur gerät CDK11 auch beim Multiplen Myelom nach umfassenden Genomanalysen zunehmend in das Blickfeld der Forschung [82] [83].

Im Gegensatz zu den genannten Befunden ergibt sich jedoch bei östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs Zelllinien ein in der Konsequenz völlig anderes Bild. Es wurde gezeigt, dass CDK11_{p58} über eine Inhibierung von Integrin β -3 eine zelluläre Invasion im Sinne einer Metastasierung reduzieren kann [84]. Über eine verminderte VEGF Expression durch CDK11_{p58} wird zudem das Zellwachstum über eine reduzierte Angiogenese gehemmt [85]. Im Prostatakarzinom wurde ein geringeres Potential zur Metastasierung nachgewiesen, was auch an dieser Stelle über eine Inhibition von Integrin β -3 sowie der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) geschieht [86].

Zusammenfassend zeigt sich ein ambivalentes Bild in Bezug auf die onkologische Bedeutung von CDK11 insgesamt, was jedoch auf die verschiedenen Isoformen und deren unterschiedliche Funktionen zurückgeführt wird [79] [84]. Nichtsdestotrotz gelangte CDK11 aufgrund der oben beschriebenen vielfältigen Funktionen in jüngster Zeit in den Fokus als potentiell Angriffsziel in der Krebstherapie [54].

2.2.2.2 Nervensystem und HIV

Auch in Bezug auf neuronale Strukturen wird die Bedeutung von CDK11 für das Zellwachstum deutlich.

Erhöhte Konzentrationen von CDK11_{p58} sowie Cyclin D3 reduzieren die Proliferation der Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem nach Entzündungen [87]. Die induzierte Apoptose steht dabei mit einem herunterregulierten AKT Signalweg in Verbindung [88]. Nach Verletzungen des Rückenmarks von Ratten zeigte sich eine Dynamik in der Expression von CDK11_{p58} für einige Tage, welche im gesunden Gewebe nicht vorhanden ist. So steigt die Expression bis zum dritten Tag an um anschließend wieder abzufallen. Auch hier scheint es Interaktionen mit Cyclin D3 im Rahmen der Wundheilung zu geben [89]. Möglicherweise steht CDK11 über Entzündungsprozesse im Rahmen der Alzheimer Erkrankung mit dieser in ursächlichem Zusammenhang [90].

Auf die Bedeutung von CDK11_{p110} für die HIV-Replikation wurde in 2.3.2.1 bereits hingewiesen [59]. Aber auch in therapeutischer Hinsicht sind CDKs und speziell CDK11 interessant, da sie möglicherweise über „*small molecules*“ latente HIV-1-Infektionen der Immunabwehr zugänglich machen können [91].

2.3 Die E2F – Proteinfamilie

2.3.1 E2F – Struktur und Regulation

Die Entdeckung der ersten E2F-Proteine geht auf die Mitte der 1980er Jahre zurück, als sie in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren erstmals beschrieben wurden [92] [93]. Die E2F-Familie umfasst beim Menschen 8 Proteine (E2F1-8) mit der gemeinsamen Eigenschaft zur Kontrolle des Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase [94] [95]. Inhibiert werden die E2Fs dabei durch Bindung an das Retinoblastom-Protein (pRb) bzw. die strukturverwandten Pocket-Proteine p107 und p130 [96].

Zusätzlich sind die E2F-Proteine v.a. auch bei der Zelldifferenzierung, der DNA-Reparatur und der metabolischen Homöostase beteiligt (siehe Abbildung 6) [7]. Bis vor wenigen Jahren wurde die E2F-Superfamilie in zwei Subgruppen differenziert, die auf *in vitro* Studien basierend entweder als „aktivierend“ (E2F1-3) oder „hemmend“ (E2F4-8) bezeichnet wurden [97] [98]. Dieses Modell gilt mittlerweile aufgrund seiner Unterkomplexität als nicht mehr haltbar [99] [98].

Darüber hinaus hat jedes E2F-Protein noch spezifische Funktionen, welche z. T. über die Phosphorylierung von regulatorischen Pocket-Proteinen gesteuert werden [97]. Im Fall von E2F1-3 erfolgt diese Phosphorylierung durch die Cyclin-abhängige Kinase 2 und beendet auf diese Weise die Transkription von Zielgenen [100] [7].

Das Potential zur Einleitung der Apoptose ist charakteristisch für die Gruppe E2F1-3 [101] [102]. Darunter nimmt E2F1 aufgrund seiner Potenz eine herausragende Stellung ein [103].

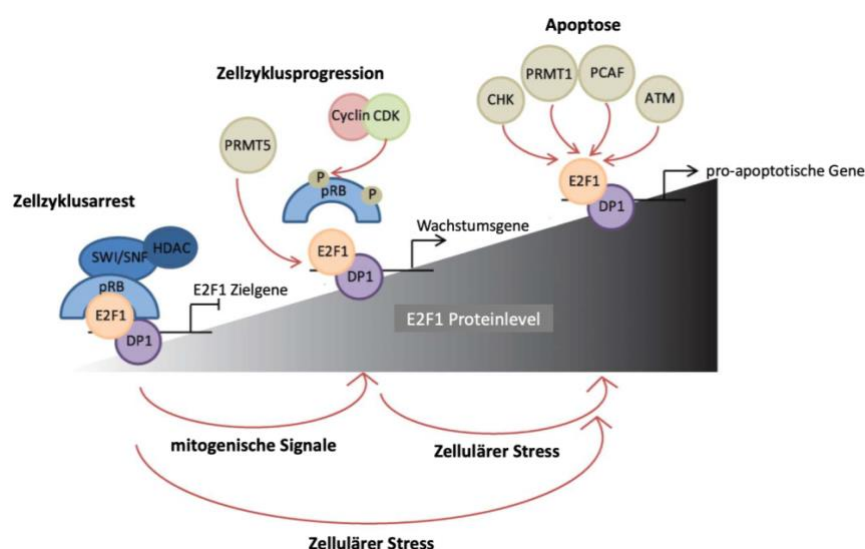


Abbildung 6: Zellzyklusabhängige Regulation von E2F1 [7]

2.3.2 E2F1 – Funktion

E2F1 war der erste Vertreter aus der Familie der E2F-Proteine, welchem durch die Bindung an den Tumorsuppressor pRb eine exakte Funktion zugeschrieben werden konnte [102]. Das dephosphorylierte pRb liegt in einem Komplex mit E2F1 vor und deaktiviert es auf diese Weise [104] [105]. Nachdem die Cyclin-abhängigen Kinasen 4/6 während des Zellzyklus Cyclin-D vermittelt das pRb phosphoryliert haben, kann sich E2F1 aus dem Komplex lösen und funktionell aktiv werden, indem es zusammen mit DP-Proteinen DNA-Bindungsstellen besetzt und weitere Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren für die Proteinsynthese rekrutiert [106] [107] [7]. Die dabei gebildeten Proteine ermöglichen den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und konsekutiv die Mitose, sowie Proliferation der Zelle [108] [109].

Die Rolle von E2F1 im Rahmen der DNA-Reparatur kann an dieser Stelle nur kurz angerissen werden, jedoch ist es in der Lage, entweder Gene zwecks DNA-Reparatur zu transkribieren oder andernfalls die Zelle bei irreparablen Schäden u.a. p73-vermittelt in die Apoptose zu überführen [110] [111]. Daneben kann die Zelle auch durch Regulierung mitochondrialer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL die Apoptose einleiten [112].

Neben der Inaktivierung von E2F1 über die Komplexierung mit pRb gibt es noch weitere Varianten, bei der z. B. über veränderte Chromatinstrukturen pRb-abhängig der Zellzyklusarrest erreicht werden kann [113]. Die E2F1-induzierte Transkription kann jedoch auch über DP-4, ein weiteres Mitglied der o. g. Proteinfamilie, unabhängig von pRb inhibiert werden [114]. Hauck *et al.* fanden einen E2F1-spezifischen Transkriptionsfaktor, welcher einerseits die E2F1-abhängige Transkriptionsaktivität beeinflusst und andererseits die Apoptoseinduktion unterdrückt. Dies geschieht dabei über einen pRb-unabhängigen Weg [115]. Über eine Herunterregulierung von Mcl-1 ist E2F1 zur Auslösung der Apoptose in der Lage [116] (siehe Exkurs: ABT-737).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Komplexität der zellulären Funktionen von E2F1 bis heute lediglich in Ansätzen verstanden sind und viele Interaktionen bisher nicht entschlüsselt werden konnten [7].

2.3.3 Pathophysiologie von E2F1 in Tumoren

Verglichen mit der Anzahl an somatischen Mutationen in p53 und pRb im Rahmen der Tumorentstehung erscheint E2F1 selbst eher selten betroffen [7, 117]. Doch viele mit E2F1 interagierende Proteine wie CDK4/6, p16^{INK4A} und DP-1 sind häufig mutiert und funktionell verändert [118] [119]. Verkomplizierend kommt hinzu, dass E2F1 in der Lage ist, die Apoptose zu induzieren und gleichzeitig für eine gesteigerte Chemoresistenz, sowie gesteigerte Zellinvasivität sorgen kann (vergleiche Abbildung 7) [99] [120] [121] [122]. Letztlich scheint in allen Fällen eine reduzierte Fähigkeit zur Zellzykluskontrolle zu bestehen, mit eingeschränkter Möglichkeit zur Überführung der Zelle in die Apoptose. Die Rolle von E2F1 in einigen Tumoren soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

2.3.3.1 E2F1 im Nierenzellkarzinom

Der Zusammenhang zwischen der Expression von E2F1 und dem Nierenzellkarzinom wurde in den letzten Jahren zunehmend aufgedeckt [123] [124] [18]. Über den von-Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressor und den Hypoxie-induzierten-Faktor- α (HIF) wird die E2F1-Expression reguliert, was als unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben klinisch relevant ist [125]. Demnach ist E2F1 in Tumoren mit ≤ 7 cm Durchmesser signifikant höher exprimiert [123].

Über die Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 durch E2F1 wird den Zellen die Gefäßinfiltration und somit die Metastasierung ermöglicht [126]. Auch der von E2F1 beeinflusste Signalweg über miR-520/372/373-SPOP scheint durch Erhöhung des Metastasierungspotentials den Tumorprogress zu beschleunigen [127]. Weiterhin wurde beobachtet, dass über KLF6 die Expression von E2F1 reguliert wird und in der Folge die Malignität im RCC gesteigert wird [128]. Das Onkogen c-Myc ist im RCC oft überaktiviert und induziert erhöhte E2F1-Expressionen mit der Folge einer gesteigerten Proliferation im RCC [18]. Jüngst beschrieben Zou *et al.* die Wirkungssteigerung des mTOR-Inhibitors Everolimus durch einen zusätzlich verabreichten ERK-Inhibitor in einer *in-vitro* Studie. Dies geschieht über eine Inhibierung der Transkription von RRM1 und RRM2, welche E2F1 vermittelt erfolgt. In der Folge ist die Proliferation reduziert [129]. Dies ermöglicht unter Umständen die therapeutische Möglichkeit zu einer zukünftigen Kombinationstherapie.

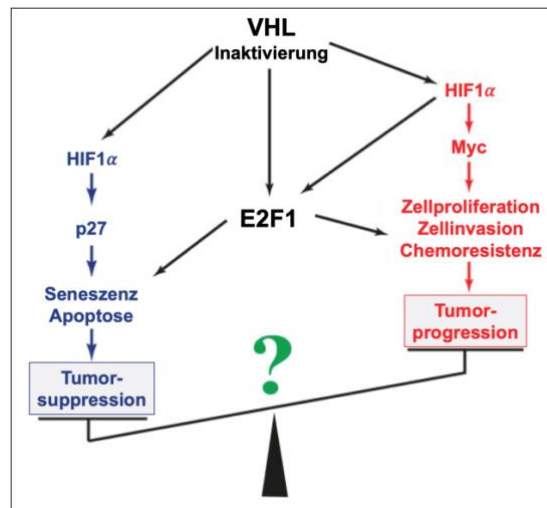


Abbildung 7: Schematische Darstellung der gegensätzlichen Funktionen von E2F1 bei VHL Inaktivierung [130]

2.3.3.2 E2F1 in weiteren Tumoren

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen und des ubiquitären Vorkommens, spielen durch veränderte E2F1-Expression verursachte Zellfunktionsstörungen auch in der Karzinogenese weiterer Tumoren eine entscheidende Rolle.

Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ist der Nachweis von E2F1 ein negativer prognostischer Marker im Hinblick auf das Gesamtüberleben nach operativer Therapie [131] [132]. Dies gilt auch für Patienten mit Pankreaskarzinom [133]. Bei Patientinnen mit Brustkrebs scheinen hohe mRNA-Konzentrationen von E2F1 mit einer schlechteren Prognose einherzugehen [134].

Die entgegengesetzte Beobachtung wurde interessanterweise beim Ösophagus-Adenokarzinom gemacht, bei dem die E2F1-Expression positiv mit dem Überleben korreliert [135]. Im Fall des Adenokarzinoms des Magens ist die Datenlage was die E2F1-Expression widersprüchlich [136] [137] [138]. Banerjee *et al.* fanden bei Patienten mit metastasiertem Kolorektalkarzinom in den Lungenmetastasen deutlich höhere E2F1-Werte als in Lebermetastasen dieser Patienten [139]. Im Ovarialkarzinom spielen, vergleichbar im NZK, die Transkription von MMP-2 und MMP-9 eine Rolle bei der Migration und Invasion von Tumorzellen [140].

Im Gegensatz dazu konnte bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) kein Zusammenhang zwischen der Expression und dem Überleben festgestellt werden [141].

In Zusammenschau muss man feststellen, dass es scheinbar einen tumorabhängigen Ausschlag zugunsten der normalerweise ausgeglichenen

pro-apoptischen oder proliferativen Funktion von E2F1 gibt, der in der Folge die Zellzykluskontrolle aushebelt und zur zellulären Entartung führt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende adhärent wachsende humane Zelllinien verwendet:

ACHN	Nierenzellkarzinom
786-O	Nierenzellkarzinom
769-P	Nierenzellkarzinom

3.1.2 Kulturmedien und Zusätze

Tabelle 2: Verwendete Medien und Zusätze

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Gibco™ RPMI 1640 Medium	21875091	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	F7524	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	P0781	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Opti-MEM™ GlutaMAX™ Supplement	51985-026	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.3 siRNA-Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete siRNA-Oligonukleotide

Zielgen	Konzentration	Artikelnummer	ID	Hersteller
CDK11 B	20 µM	4392421	s2734	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CDK11 B	20 µM	4392421	s2733	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
E2F-1	20 µM	4390824	s4406	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TARGETplus Non-targeting Pool	20 µM	D-001810-10-20	19361222	Dharmacon, Lafayette, USA

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
2-Propanol	818766	Merck Schuchardt, Hohenbrunn
ABT-737	–	Abbott Laboratories, Abbott Park, USA
Acrylamidstammlösung 30%	3029	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	8076.3	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	9178	Carl Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA), purified 100x	B9001S	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Bromphenolblau	A512	Carl Roth, Karlsruhe
CASYton	5651808	OMNI Life Science GmbH & CO. KG, Bremen
Coumarinsäure	C9008	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	W387520	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	A1101	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco´s PBS ohne Calcium- und Magnesiumchlorid	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS) mit Calcium- und Magnesiumchlorid	D8662	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	3738	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	24194	Honeywell Research Chemicals, Seelze
Everolimus	07741	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	G7757	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	3187	Carl Roth, Karlsruhe
Lipofectamin® 2000 Reagent	116680	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luminol	A8511	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lysepuffer	9803S	Cell Signaling Technologies, Denver, USA
Magermilchpulver	A0830	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	32213	Honeywell Research Chemicals, Seelze
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	8142	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	A1430	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20765	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ponceau S	5938	Carl Roth, Karlsruhe
Protease&Phosphatase Inhibitor Cocktail	78440	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Salzsäure	4625	Carl Roth, Karlsruhe

Fortsetzung Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Sunitinib-Malat	PZ0012	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	T1503	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-buffered saline (TBS)	A5001	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin	T4049	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	SKU 02193971-CF	MP Biomedicals, Eschwege
WesternBright™ Sirius™ HRP Substrat	K-12043	Advansta Inc., San Jose, USA

3.1.5 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blottingkammer	Trans-Blot® Turbo™	BioRad, München
Chemolumineszenz Imager	Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhadtzell
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Bioscience, San Jose, USA
Netzgerät SDS	PowerPaCT™	BioRad, München
Elektrophoresekammer für SDS	Mini-PROTEAN® Tetra System	BioRad, München
Heizblock	Techne Dri-Block® DB 2D	Cole-Parmer, Staffordshire, UK
Inkubator	HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop	Eclipse TS100-F	Nikon, Tokyo, Japan
Magnetrührer	RETbasic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Mikrozentrifuge	Z 216 MK	HERMILE Labortechnik GmbH, Wehingen
pH-Meter	pH-Labormessgerät inoLab®	WTW-a xylem brand, Dinslaken
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Bioscience
Spektralphotometer	Tecan Spark 10M	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Sterilbank	LaminAir® HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge	Galaxy Mini	VWR International GmbH, Darmstadt
Trockenschrank	Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	Reax Control	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Waage	Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Zellzählsystem CASY	CASY Cell Counter and Analyzer	OMNI Life Science GmbH & CO. KG, Bremen
Zentrifuge	Heraeus™ Multifuge™ X3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.6 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
AK-Puffer	5% BSA (w/v) in TBST (1fach konzentriert) 0,05% (w/v) NaN ₃
Detektierlösung	10 mL Tris (100 mM Tris/HCl, pH 8,5) 50 µL Luminol (250 mM in DMSO) 25 µL Coumarinsäure (90 mM in DMSO) 4 µL H ₂ O ₂ (30%ig)
Kristallviolett-Lösung	1% (w/v) Kristallviolett 10% (v/v) Methanol
Ponceau S Färbelösung	0,5% (w/v) Ponceau S 1% (v/v) konzentrierte Essigsäure
Protein-Probenpuffer (6fach konzentriert)	350 mM Tris/HCl, pH 6,8 10,28% (w/v) SDS 36% (w/v) Glycin 600 mM DTT Spatelspitze Bromphenolblau
Proteinlysepuffer (1 mL)	100 µL Lysepuffer 20 µL Protease&Phosphatase Inhibitor Cocktail
Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl, pH 6,8
SDS-PAGE Laufpuffer (10fach konzentriert)	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
<i>Semi-dry</i> Transferpuffer (10fach konzentriert)	480 mM Tris/HCl, pH 9-9,2 390 mM Glycin 0,375% (w/v) SDS
<i>Semi-dry</i> Transferpuffer (1fach konzentriert)	10% (v/v) <i>Semi-dry</i> Transferpuffer (10x) 20% (v/v) Methanol
TBST (1 L)	1% (v/v) TBS (10x) 0,1% (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

3.1.7 Antikörper

Alle für den Immunoblot verwendeten Primärantikörper wurden in 5 %iger BSA/TBST-Lösung angesetzt.

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
AKT	Kaninchen	1:1000	9272	Cell Signaling, Boston, USA
Bak	Kaninchen	1:200	sc-832	Santa Cruz, Heidelberg
Bax	Kaninchen	1:1000	5023	Cell Signaling, Boston, USA
Bcl-2	Kaninchen	1:1000	2870	Cell Signaling, Boston, USA
Bcl-xL	Kaninchen	1:2000	2764	Cell Signaling, Boston, USA
Bim	Kaninchen	1:1000	2933	Cell Signaling, Boston, USA
CDK11	Kaninchen	1:1000	5524	Cell Signaling, Boston, USA
E2F-1	Kaninchen	1:1000	3742	Cell Signaling, Boston, USA
ERK1/2	Kaninchen	1:2000	9102	Cell Signaling, Boston, USA
GAPDH	Maus	1:1000	sc-32233	Santa Cruz, Heidelberg
I κ B- α (FL)	Kaninchen	1:200	sc-847	Santa Cruz, Heidelberg
LC-3	Kaninchen	1:1000	L7543	Sigma, Deisenhofen
Mcl-1	Kaninchen	1:1000	sc-819	Santa Cruz, Heidelberg
p-H2A.X (S139)	Kaninchen	1:1000	9718	Cell Signaling, Boston, USA
p21	Kaninchen	1:500	2947	Cell Signaling, Boston, USA
p62	Kaninchen	1:1000	5114	Cell Signaling, Boston, USA
p-S6 (S240/44)	Kaninchen	1:1000	5364	Cell Signaling, Boston, USA
p70S6K	Kaninchen	1:1000	9202	Cell Signaling, Boston, USA
p-AKT (S473)	Kaninchen	1:2000	4060	Cell Signaling, Boston, USA
p-ERK (T202/T204)	Kaninchen	1:1000	9101	Cell Signaling, Boston, USA
p-I κ B- α (FL)(S32/S36)	Maus	1:2000	9246	Cell Signaling, Boston, USA
p-p70S6K (T389)	Maus	1:1000	9206	Cell Signaling, Boston, USA
RFC4	Maus	1:200	sc-28301	Santa Cruz, Heidelberg
S6	Maus	1:1000	2317	Cell Signaling, Boston, USA
Vinculin	Kaninchen	1:1000	4650	Cell Signaling, Boston, USA

Fortsetzung Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper

Primärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
β -Tubulin	Kaninchen	1:1000	2128	Cell Signaling, Boston, USA

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Artikelnummer	Hersteller
Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Ziege- α -Kaninchen Antikörper IgG (H&L)	170-6515	BioRad, München
Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Ziege- α -Maus Antikörper IgG (H&L)	170-6516	BioRad, München

Die verwendeten Sekundärantikörper wurden alle in einer Verdünnung von 1:3000 in Milch/TBST angesetzt.

3.1.8 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 9: Benutzte Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Artikelnummer	Hersteller
96-Well-Platten	655180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	352054	Corning Incorporated, Corning, USA
Nitrocellulosemembran	1620115	BioRad, München
Pipetten, 5 mL	606180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten, 10 mL	607180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten, 25 mL	760180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 10 μ L	VT0200	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Pipettenspitzen, 100 μ L	VT0230	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Pipettenspitzen, 1000 μ L	07-379-2015	nerbe plus GmbH, Winsen
Reaktionsgefäß, 1,5 mL	0030 123.328	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß, 15 mL	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 50 mL	227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatmanpapier	3030-690	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	430641U	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturschale, 10 cm	664160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale, 6 cm	628160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.9 Kits

- Annexin V Apoptosis Detection Kit I (#559763), BD Biosciences Pharmingen, San Diego/USA
- FITC BrdU Flow Kit (#51-2354AK), BD Biosciences Pharmingen, San Diego/USA
- WesternBright™ Sirius™ Detection Kit (#K-12043-D10), Advansta Inc., San Jose/USA

3.1.10 Software und Statistik

Fusion© Software, Evolution-Capt (Vilber Lourmat, Eberhardtzell)

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA)

SparkControl Version 2.1 (TecanGroup, Männedorf, Schweiz)

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Die erhaltenen Werte wurden zunächst mit *one-way* bzw. *two-way* ANOVA (*analysis of variance*) und anschließend mit dem Tukey-Test analysiert. Es wurden p-Werte mit $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

Tabelle 10: P-Werte

Symbol	p-Wert
***	< 0,001
**	< 0,01
*	< 0,05
n.s.	> 0,05

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultivierung

Die adhärent wachsenden humanen Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C mit einem CO₂-Anteil der Luft von 5 % kultiviert. Als Kultivierungsmedium diente mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) versetztem RPMI-1640. Bei konfluentem Zellwachstum wurden die Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturflasche abgelöst und in einem bestimmten Verhältnis in frischem Medium ausgesät (ACHN 1:5, 786-O 1:12, 769-P 1:10). Um Kontaminationen zu vermeiden, fand die Arbeit mit den Zelllinien ausschließlich unter einer Sterilbank statt.

3.2.1.2 Kryokonservierung

Die Zellen können über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert werden. Hierfür wurden die trypsinierten Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C pelletiert, in 1 mL Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FCS in RPMI-1640) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt.

Zunächst erfolgte die Kühlung bei -80 °C in mit Isopropanol gefüllten Kryo-Boxen, später dauerhaft in flüssigem Stickstoff. Diese schrittweise Kühlung (Kühlrate) ist wichtig für die Überlebensrate der Zellen nach dem Einfrieren. Bei zu hoher Kühlrate bilden sich intrazelluläre Eiskristalle, die zu Zellschäden führen.

Das Auftauen von Zellen erfolgte sehr schnell, um die zytotoxische Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur möglichst gering zu halten. Dabei wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Trockenschrank aufgetaut und zügig in eine Zellkulturflasche mit bereits vorgewärmten Medium überführt. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des CASY-Zellzählsystems bestimmt. Hierbei wurde etwas Casylösung in ein Casytube vorgelegt und mit 100 µL trypsiniertes

Zellsuspension versehen. Für die Messung wurde das Casytube im Gerät positioniert und die Zellzahl abgelesen.

3.2.1.4 Transfektion

Durch Lipofektion wurde siRNA in die Zellen eingebracht. Diese Methode der RNA-Interferenz wurde verwendet, um die Translation des Zielproteins zu verhindern und so die Funktionen dieses Proteins zu untersuchen und aufzuklären. Die verwendeten siRNAs wurden stets mit einer Kontroll-siRNA, in den folgenden Abbildungen als *scram* bezeichnet, verglichen.

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in eine 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der siRNA mit Hilfe von Lipofectamin® 2000. Hierbei wurde die siRNA zunächst 1:1000 in Optimem verdünnt. Das Lipofectamin wurde ebenfalls in Optimem vorgelegt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die siRNA-Lösung 1:1 mit der Lipofectamin-Lösung vermischt, so dass die Gebrauchskonzentration der siRNA 5 nM betrug, und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen des RPMI-Mediums, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend pro Zellkulturschale mit 1,5 mL der siRNA/Lipofectamin/Optimem-Lösung behandelt. Nach 6 h wurden pro Zellkulturschale 1,5 mL RPMI-Medium auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 48 h bzw. 72 h nach Transfektion für weitere Versuche verwendet.

3.2.1.5 Kristallviolettffärbung

Bei der Kristallviolettffärbung nach Gillies handelt es sich um ein spektralphotometrisches Verfahren zur quantitativen Zellzahlbestimmung [142]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Methode die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Zellviabilität untersucht. Zunächst wurden 10^4 transfizierte Zellen/well in 100 μ L/well RPMI-Medium in eine 96-well Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen für 48 h bzw. 72 h inkubiert. Nachdem das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen einmal mit 100 μ L/well Dulbecco's PBS (im Folgenden mit PBS abgekürzt) wurde, erfolgte die 15-minütige Fixierung der Zellen mit 100 μ L/well eines Methanol/Ethanol-Gemisches (Verhältnis MeOH:EtOH 2:1). Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt und einmal mit 100 μ L/well PBS gewaschen. Die

Färbung der Zellen erfolgte mittels 30-minütiger Inkubation mit Kristallviolett-Färbelösung unter dauerhaftem Schütteln. Hierbei werden die Zellkerne der Zellen gefärbt, wobei nur vitale Zellen erfasst werden, da sich tote Zellen vom Plattenboden ablösen und mit dem Überstand verworfen werden. Das überschüssige Kristallviolett wurde im Anschluss mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) ausgespült und die Platte über Nacht getrocknet. Am folgenden Tag wurden 100 µL 33 %ige Essigsäure pro *well* vorgelegt und 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Absorption wurde in einem Spektralphotometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Lysaten

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die Zellen 48 h oder 72 h nach Transfektion lysiert. Dabei wurden die Zellen, nach dem Absaugen des Mediums, einmal mit kaltem PBS gewaschen. Abhängig von der Zellzahl wurden 50 – 70 µL Lysepuffer (Tabelle 4) auf die Zellen pipettiert, diese anschließend mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und danach für 20 min bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, der Rest wurde verworfen. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Proben stets auf Eis gelagert.

3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford herangezogen [143]. Hierbei handelt es sich um ein photometrisches Verfahren, das auf der Änderung des Absorptionsmaximums des eingesetzten Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 beruht. Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm wird durch die Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes an Seitenketten basischer und aromatischer Aminosäuren ausgelöst und kann mit einem Spektrophotometer gemessen werden. Da es sich um eine Relativmethode handelt, muss für die Analyse der Proben eine Eichgerade mit BSA-Protein bekannter Proteinkonzentration als Standard herangezogen werden.

Für die Messung wurden 2 µL Probe mit 798 µL bidestilliertem Wasser (bidest. H₂O) in eine 96-well Platte vorgelegt und mit 200 µL Protein-Assay Reagenz versetzt. Die Absorptionen der Proben und der zuvor angesetzten Standardreihe (0, 1, 5, 10 und 15 µg/µL BSA) wurden bei 595 nm gemessen und die Konzentrationen der Proteinlysate mit Hilfe der Eichgeraden berechnet.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine in einem Proteingemisch elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt werden [144]. Hierzu wurden die Lysate mit 5fachem Laemmli-Puffer und Lysepuffer so eingestellt, dass 30 µg Protein in einem Volumen von 20 µL enthalten waren. Das 5-minütige Erhitzen der Proteine bei 95 °C diente der Denaturierung, durch das im Puffer enthaltene SDS wurde die Eigenladung der Proteine überdeckt. Darüber hinaus soll das anionische Detergens zusammen mit der Denaturierung zu einer Linearisierung der Proteine führen, die alle eine negative Ladung aufweisen und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Das Polyacrylamidgel setzt sich zusammen aus einem Trenn- und Sammelgel. Das großporige Sammelgel (5%iges Gel) lässt eine nahezu ungehinderte Migration der Proteine zu. Am Übergang zum Trenngel kommt es durch die verkleinerten Poren zu einer vorübergehenden Konzentration der Proteine, die durch weitere Migration im Trenngel schließlich der Größe nach aufgetrennt werden. Hierbei können die kleineren Proteine ungehindert durch das Trenngel wandern, wohingegen größere Proteine stärker zurückgehalten werden. Die Zusammensetzung der Gele ist in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

10 %iges Trenngel, 20 mL	15 %iges Trenngel, 20 mL	5 %iges Sammelgel, 8 mL
8,0 mL ddH ₂ O	4,8 mL ddH ₂ O	4,6 mL ddH ₂ O
5,2 mL Trenngelpuffer	5,2 mL Trenngelpuffer	2,0 mL Sammelgelpuffer
6,8 mL 30 % Acrylamid	10 mL 30 % Acrylamid	1,32 mL 30 % Acrylamid
200 µL 10 % SDS	200 µL 10 % SDS	80 µL 10 % SDS
200 µL 10 % APS	200 µL 10 % APS	80 µL 10 % APS
8 µL TEMED	8 µL TEMED	8 µL TEMED

Nachdem die Taschen im Sammelgel mit den Proben und dem Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (siehe Tabelle 3) beladen wurden, erfolgte

die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 120 V für etwa 90 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel vorsichtig abgetrennt und das Trenngel für den Western Blot verwendet.

3.2.2.4 Western Transfer

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels *Semi-Dry* Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auch dieses Prinzip beruht auf der Migration der negativ geladenen Proteine Richtung Anode. Hierzu muss das angelegte elektrische Feld senkrecht zum Polyacrylamidgel sein. Nach kurzer Äquilibrierung von Nitrozellulosemembran, Whatman-Papier und des Gels, wurden 3 Schichten Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Gel und weitere 3 Schichten Whatman-Papier luftblasenfrei in der Transferzelle übereinandergeschichtet. Das Blotten erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 30 min.

Für eine optische Kontrolle wurde die Membran anschließend mit Ponceau S, ein roter, an kationische Aminosäurereste bindender Azofarbstoff, reversibel angefärbt. Dieser wurde einmal für 10 min mit TBST gewaschen.

3.2.2.5 Immunoblot-Analyse

Die Untersuchung der Proteine durch Immundetektion erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Hierbei wurden spezifische Primärantikörper, die gegen das gewünschte Protein gerichtet sind, und speziesspezifische Sekundärantikörper, die an den Primärantikörper binden, verwendet. Der Sekundärantikörper ist zudem an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, ein Enzym, das die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysiert. Das dabei erzeugte irisierende Licht wurde durch einen Chemolumineszenzdetektor erfasst.

Um freie Bindungsstellen der Membran zu besetzen wurde diese mit 5 %iger Milch/TBST-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal 10 min. mit TBST gewaschen. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte im Anschluss an die Blockierung der Membran und bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und in einem 50 mL Reaktionsgefäß bei -20 °C gelagert. Die Membran wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen, mit dem Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur

inkubiert und erneut dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Für die Detektion wurde entweder selbst angesetzte Coumarin-Luminol-H₂O₂-Lösung oder das WesternBright™ Sirius™ Detection Kit verwendet.

3.2.2.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung von Form, Struktur, Färbung und weiteren Eigenschaften von Zellen. Hierbei werden Zellen während der Messung einzeln durch eine Durchflusszelle gesaugt, in der sie auf einen fokussierten Laserstrahl treffen. Ein Teil des Lichts wird von den Zellen gestreut, was mit Hilfe von Detektoren erfasst wird. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Lichtbeugung und liefert Informationen zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) ist ein Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel und lässt Aussagen über Zellgranularität, sowie Größe und Struktur des Zellkerns zu. Zudem können die Zellen mit spezifischen fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern oder fluoreszierenden Farbstoffen wie DAPI oder Propidiumiodid markiert werden.

3.2.2.6.1 Bestimmung der Apoptose-Rate

Die Apoptosebestimmung in Zellen beruht auf der biologischen Funktion des Membranproteins Phosphatidylserin. Dieses befindet sich auf der zytosolischen Seite der Zellmembran, bis die Zelle in die Apoptose getrieben wird. Bereits in einem sehr frühen Stadium der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Membran befördert und dient dort als Signal für Phagozytose. Mithilfe von Annexin V, einem calciumabhängigen Protein, können apoptotische Zellen im Durchflusszytometer erfasst werden. An einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, bindet Annexin V an Phosphatidylserin. Um falsch positive Ergebnisse durch nekrotische Zellen auszuschließen, werden die Zellen zusätzlich mit 7-AAD, einem DNA-Interkalator, gefärbt. Dieser Farbstoff kann keine intakte Zellmembran passieren und ist somit ein Maß für spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert. Für die Apoptoseinduktion in den Zellen wurde ABT-737 verwendet. Dieses wurde 48 h nach Transfektion in einer Konzentration von 10 µM und 20 µM in den ACHN und 786-O

Zelllinien und 5 μM und 10 μM in den 769-P Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden 24 h mit ABT-737 inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Überstand in einem 15 mL Falcon gesammelt und die Zellen mit PBS gewaschen, wobei der Überstand erneut im 15 mL Falcon gesammelt wurde. Die trypsinisierten Zellen wurden ebenfalls im selben 15 mL Falcon gesammelt und 5 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 μL 1x Binding Puffer resuspendiert und mit 4 μL Annexin V-FITC und 3,5 μL 7-AAD versehen. Die Zellsuspension wurde kurz gevortext und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 μL 1x Binding Puffer dazugegeben und die Zellsuspension in ein FACS Röhrchen filtriert. Die Proben wurden mit einem Durchflusszytometer gemessen.

3.2.2.6.2 BrdU-Assay

Mit dem Bromdesoxyuridin-Assay (BrdU) kann die Proliferation in vitalen Zellen nachgewiesen werden. Während der S-Phase des Zellzyklus, in der die DNA-Replikation stattfindet, wird anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Bromdesoxyuridintriphosphat (BrdUTP) in die DNA eingebaut. Dieses kann anschließend mithilfe eines anti-BrdU Antikörpers markiert und im Durchflusszytometer erfasst werden. Zusätzlich werden die vorher permeabilisierten und fixierten Zellen mit dem DNA-Interkalator 7-AAD gefärbt. Damit können die Zellen nach G1-, S- und G2/M-Phase unterteilt werden. Zellen in der G2/M-Phase besitzen den doppelten Chromosomensatz und haben demnach ein stärkeres 7-AAD Signal als die Zellen in der G1-Phase. Alle Zellen mit einem positiven anti-BrdU Signal befinden sich in der S-Phase.

Für den BrdU-Assay wurde das Kit von BD Biosciences verwendet. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 μM BrdU für 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die zuvor trypsinisierten Zellen geerntet und mit 1 mL Staining Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 μL BD Cytofix/Cytoperm Puffer resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL 1x BD Perm/Wash Puffer gewaschen. An diesem Punkt können die Zellen entweder kryokonserviert werden (für spätere Messungen) oder aber mit Antikörper und 7-AAD gefärbt werden.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen einmal mit 1 mL Staining Puffer gewaschen und anschließend in 1 mL Einfriermedium (10% DMSO + 90% FBS) bei -80 °C gelagert.

Zum Färben der Zellen wurden diese einmal mit 1 mL Staining Puffer gewaschen und das Zellpellet erneut in 100 µL BD Cytofix/Cytoperm Puffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 1 mL 1x BD Perm/Wash Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Zellpellet mit 100 µL einer DNase Lösung (Endkonzentration: 300 µg/mL DNase) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch diesen Schritt wird das in der DNA eingebaute BrdU wieder freigesetzt und kann von dem anti-BrdU Antikörper gebunden werden. Nach Inkubation mit DNase wurden die Zellen mit 1 mL 1x BD Perm/Wash Puffer gewaschen und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µL BD Perm/Wash Puffer mit anti-BrdU Antikörper resuspendiert (Antikörperstocklösung 1:50 in BD Perm/Wash Puffer verdünnt) und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL 1x BD Perm/Wash Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 20 µL 7-AAD Lösung resuspendiert, dann wurde 1 mL Staining Puffer hinzugefügt und die Proben durchflusszytometrisch analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Expression von CDK11 im NZK

Zunächst wurde untersucht, ob CDK11 in den NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P exprimiert wird. Hierzu wurden die Lysate der unbehandelten Zellen (Wildtyp) mittels SDS-PAGE und anschließender Immunoblot-Analyse untersucht. Die folgende Abbildung 8 zeigt eine starke Expression von CDK11_{p110} in allen 3 Zelllinien, bei denen lediglich die p110-Isoform jederzeit exprimiert war.

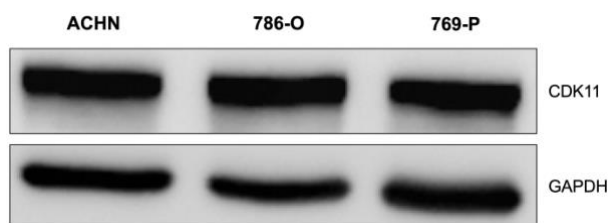


Abbildung 8: CDK11 Expression in den NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P. Die Zellen wurden lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In allen 3 untersuchten Zelllinien ist eine deutliche Expression von CDK11 nachgewiesen.

4.2 Reduzierte CDK11 Expression im NZK mittels siRNA

Für die weiteren funktionellen Analysen wurde die CDK11 Expression in den NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P mittels siRNA moduliert. Hierfür wurden die Zellen wie unter 3.2.1.4 beschrieben entweder mit einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA mit Hilfe von Lipofectamin transfiziert und 48 h später lysiert. Anschließend wurden 30 µg Protein auf einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und mittels Immunoblot-Analyse untersucht. In Abbildung 9 ist ein repräsentativer Western Blot des CDK11 Knockdowns aus in den Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P gezeigt (n = 3).

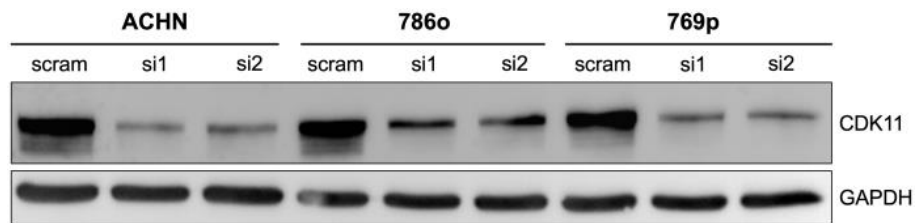


Abbildung 9: Immunoblot-Analyse des CDK11 Knockdowns: Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In allen drei Zelllinien ist eine verminderte CDK11 Expression nach erfolgter Transfektion mit CDK11-spezifischer siRNA (si1 und si2) zu sehen. Die Kontrolle mit unspezifischer siRNA zeigt hingegen eine hohe CDK11 Expression, die mit der CDK11 Expression in Wildtyp-Zellen (vgl. Abbildung 8) vergleichbar ist.

4.3 Einfluss der CDK11 Expression auf das Zellwachstum

In diesem Versuch wurde untersucht, wie sich die Expression von CDK11 auf das Zellwachstum auswirkt. Dazu wurden die Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P mit CDK11-spezifischer siRNA (si1 und si2), sowie einer Kontroll-siRNA durch Lipofektion transfiziert und ausgesät. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die Zellzahl mit Hilfe des CASY-Zellzählersystems ermittelt.

Der Einfluss der CDK11 Expression auf das Wachstum der ACHN Zellen ist in Abbildung 10 dargestellt, wobei die Anzahl vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion gezeigt wird.

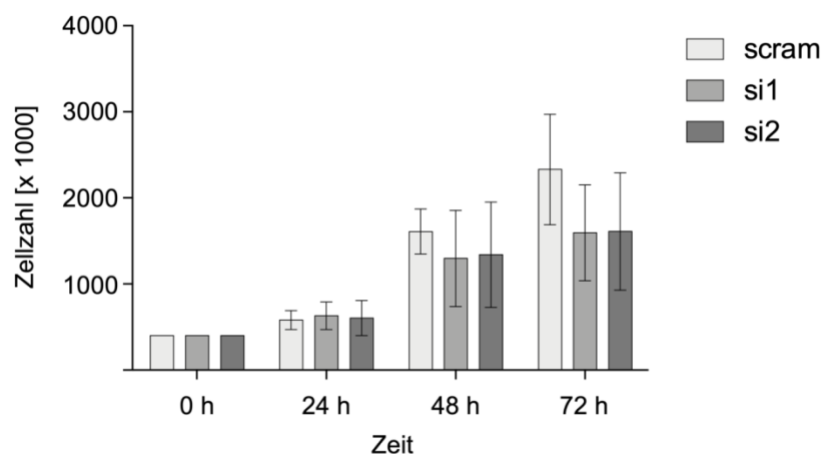


Abbildung 10: Auswirkungen der CDK11 Expression auf das Zellwachstum der ACHN Zelllinie. Die Zellzahl der ACHN Zellen wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 400.000 Zellen ausgesät. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Die Zellzahl in den Kontroll-Zellen (scram) nimmt über 72 h kontinuierlich zu. Das Zellwachstum in diesen Zellen ist tendenziell höher verglichen zu den beiden mit den CDK11 siRNAs transfizierten Zellen, jedoch kann hier kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Abbildung 11 zeigt den Einfluss der CDK11 Expression auf das Wachstum der 786-O Zellen. Dargestellt ist die Anzahl vitaler Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion.

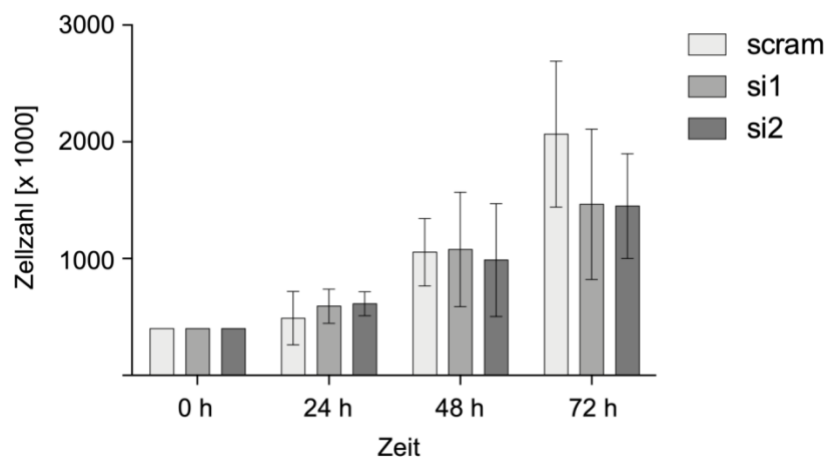


Abbildung 11: Auswirkung der CDK11 Expression auf das Zellwachstum der 786-O Zelllinie. Die Zellzahl der 786-O Zellen wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 400.000 Zellen ausgesät. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Die Zellzahl in den Kontroll-Zellen (scram) nimmt über 72 h kontinuierlich zu. Das Zellwachstum in diesen Zellen ist tendenziell höher verglichen zu den beiden mit den CDK11 siRNAs transfizierten Zellen, jedoch kann hier kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse des Zellzahl-Assays der 769-P Zelllinie zusammengefasst. Abgebildet ist die Anzahl vitaler Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion. Man sieht einen kontinuierlichen Zuwachs der Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert sind, über einen Zeitraum von 72 h. Das Zellwachstum in diesen Zellen ist signifikant höher verglichen zu den beiden mit den CDK11-spezifischen siRNA transfizierten Zellen ($p = 0,0002$; $p = 0,0027$).

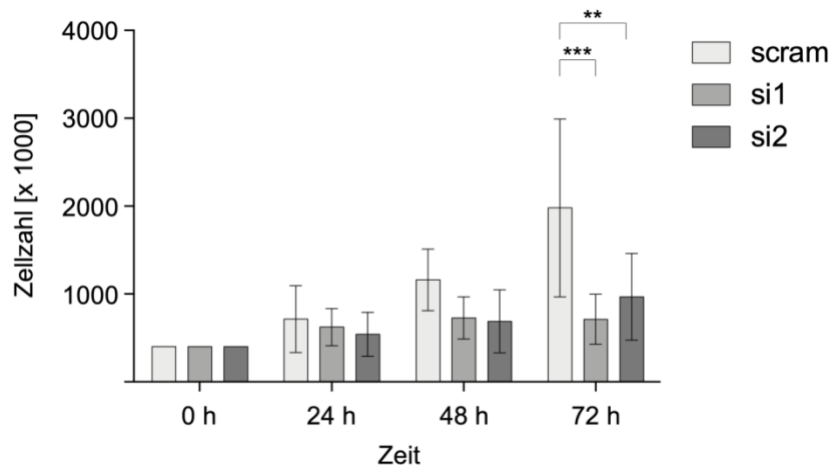


Abbildung 12: Auswirkung der CDK11 Expression auf das Zellwachstum der 769-P Zelllinie. Die Zellzahl der 769-P Zellen wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 400.000 Zellen ausgesät. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (** p < 0,01, *** p < 0,001).

In allen drei Zelllinien konnte ein Unterschied im Zellwachstum beobachtet werden. Die mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen hatten nach 72 h eine höhere Anzahl vitaler Zellen, verglichen zu den mit CDK11-spezifischer siRNA transfizierten Zellen.

In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob dieser Effekt einer geringeren Proliferation oder einer erhöhten Apoptose-Neigung zugeschrieben werden kann.

4.4 Einfluss der CDK11 Expression auf unterschiedliche Signalwege

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum in den Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P in den mit CDK11-spezifischer siRNA behandelten Zellen vermindert ist. Im Folgenden soll auf Proteinebene untersucht werden, welche Auswirkungen eine verminderte CDK11 Expression auf bestimmte Signalwege hat. Hierbei wurde die Expression von Schlüsselproteinen der wichtigsten Signalwege, wie der PI3-K/AKT Signalweg, der NF-κB Signalweg und die ERK1/2-Kaskade untersucht [145-149].

In der folgenden Abbildung 13 wird ein repräsentativer Western Blot, der die Expressionspiegel von AKT und dessen Phosphoform in Abhängigkeit der CDK11 Expression zeigt, dargestellt (n = 3).

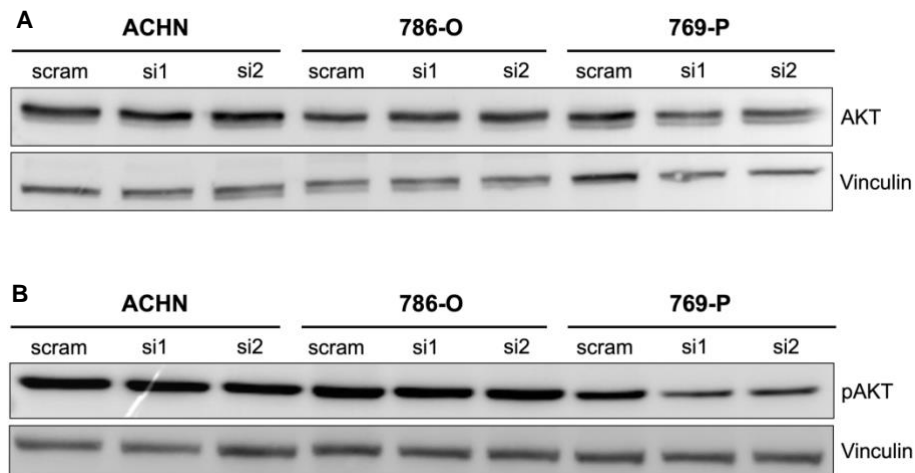


Abbildung 13: Immunoblot-Analyse der (A) AKT und (B) pAKT Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In den Zelllinien ACHN und 786-O ist kein Unterschied in der AKT Expression zu beobachten (Abbildung 13A). In den 769-P Zellen hingegen ist die AKT Expression in den Zellen mit induziert-verminderter CDK11 Expression ebenfalls reduziert. Auch die AKT Phosphorylierung ist in den 769-P Zellen merklich vermindert (Abbildung 13B).

Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der p70-S6-Kinase Expression und dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die p70-S6-Kinase reguliert Zellwachstum, indem sie für die Proteinsynthese relevante Komponenten induziert. Als Zielstruktur des mTOR-Komplexes wird die p70-S6-Kinase auch indirekt durch AKT reguliert.

In der Expression von p70-S6-Kinase können keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Abhängigkeit von der CDK11 Expression beobachtet werden. Auch die Phosphorylierung dieser Kinase ist durch CDK11 Expression nicht verändert.

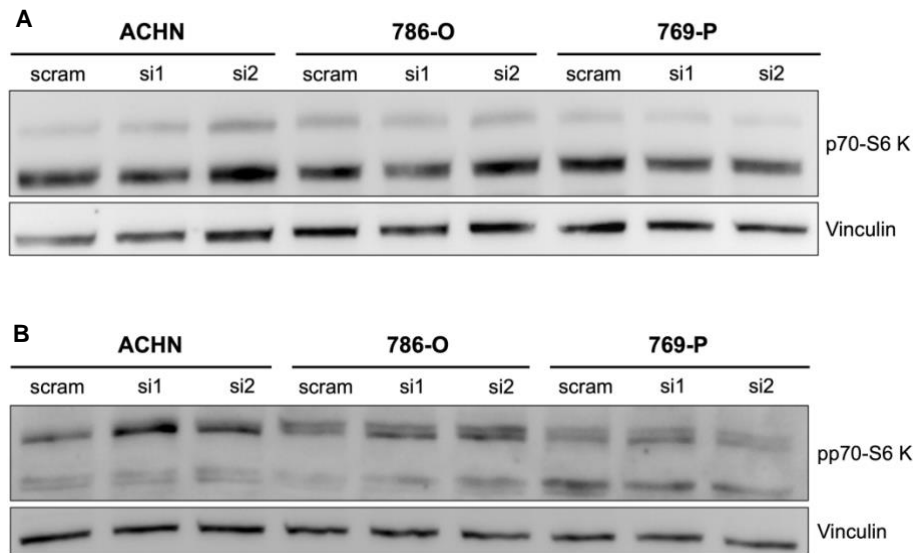


Abbildung 14: Immunoblot-Analyse der (A) p70-S6-Kinase und (B) pp70-S6-Kinase Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In Abbildung 15 ist ein repräsentativer Western Blot der S6-Kinase Expression und dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit der CDK11 Expression gezeigt. Als Zielstruktur der p70-S6-Kinase wird die S6-Kinase von dieser phosphoryliert und kann in der Folge die Translation hochregulieren, wodurch die Zellproliferation und das Zellwachstum gefördert werden.

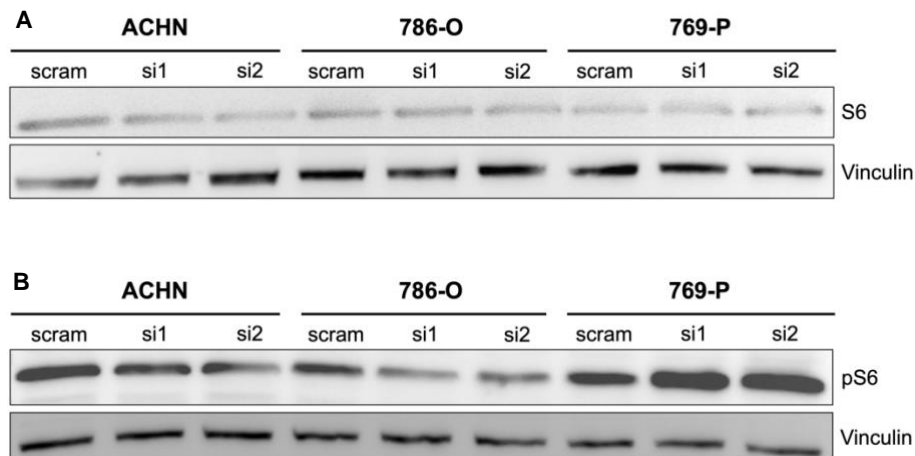


Abbildung 15: Immunoblot-Analyse der (A) S6-Kinase und (B) pS6-Kinase Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In der Expression von S6-Kinase können keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Regulation durch CDK11 beobachtet werden. Auch die Phosphorylierung dieser Kinase ist durch CDK11 Expression nicht verändert.

Die folgende Abbildung stellt einen repräsentativen Western Blot der ERK Expression und dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit der CDK11 Expression. ERK1/2 (*extracellular-signal regulated* Kinase) ist ein wichtiger Bestandteil einer

dreistufigen Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskade), die grundlegende zelluläre Prozesse, darunter Zellproliferation und -differenzierung, reguliert.

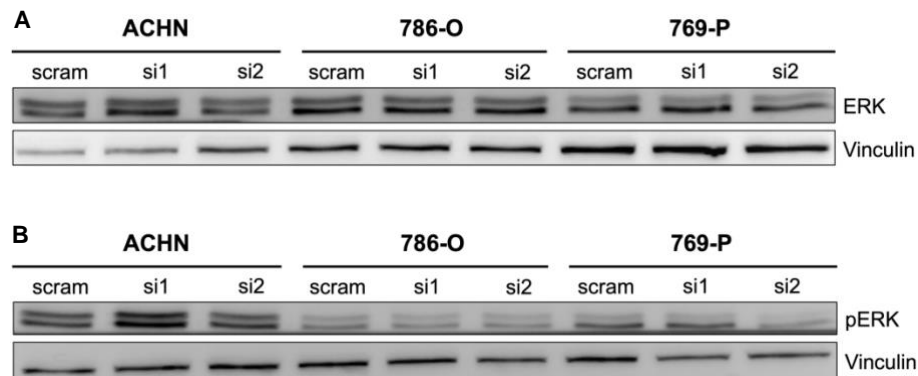


Abbildung 16: Immunoblot-Analyse von (A) ERK1/2 und (B) pERK1/2 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Die Expression von ERK1/2 zeigt keine Regulation durch CDK11. Auch die Phosphorylierung dieser Kinase scheint nicht durch CDK11 beeinflusst zu werden.

In der nächsten Abbildung ist ein repräsentativer Western Blot der IκB-α Expression und dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit der CDK11 Expression dargestellt. IκB-α fungiert als Inhibitor von NF-κB. Durch Bindung an NF-κB wird verhindert, dass dieser Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren kann [150]. Die Phosphorylierung von IκB-α markiert dieses Protein für den proteasomalen Abbau, wodurch es zu einer Aktivierung des NF-κB Signalweges kommt.

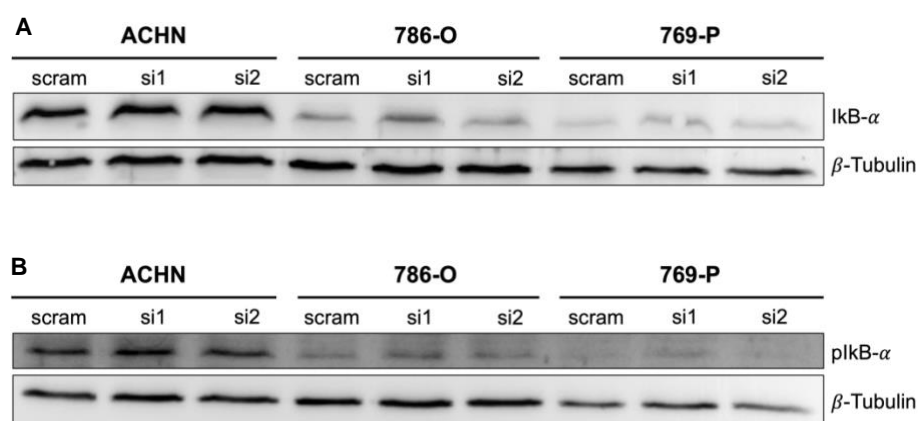


Abbildung 17: Immunoblot-Analyse von (A) IκB-α und (B) pIκB-α Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Es kann kein Unterschied in der Expression von IκB-α beobachtet werden. Auch die Phosphorylierung dieses Proteins scheint nicht reguliert zu sein.

In den 769-P Zellen konnte jedoch eine verminderte AKT-Expression mit verminderter Phosphorylierung beobachtet werden. Als zentrales Protein in verschiedenen zellulären Prozessen reguliert AKT Zellwachstum, Proliferation und die Apoptose.

Im Folgenden wird die Zellproliferation in den drei NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P genauer betrachtet.

4.5 Einfluss der CDK11 Expression auf die Proliferation

Zur Analyse der Zellproliferation unter verminderter CDK11 Expression wurde der Bromdesoxyuridin-Assay (BrdU) herangezogen. Hierfür wurden die Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P 72 h nach Transfektion mit CDK11 siRNA für 1 h mit BrdU inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Einbau dieses Nukleosids während der S-Phase ermittelt. Zusätzlich wurde durch eine intrazelluläre Färbung mit 7-AAD die Verteilung der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase untersucht.

In Abbildung 11 ist die Verteilung der unterschiedlich transfizierten ACHN Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase dargestellt.

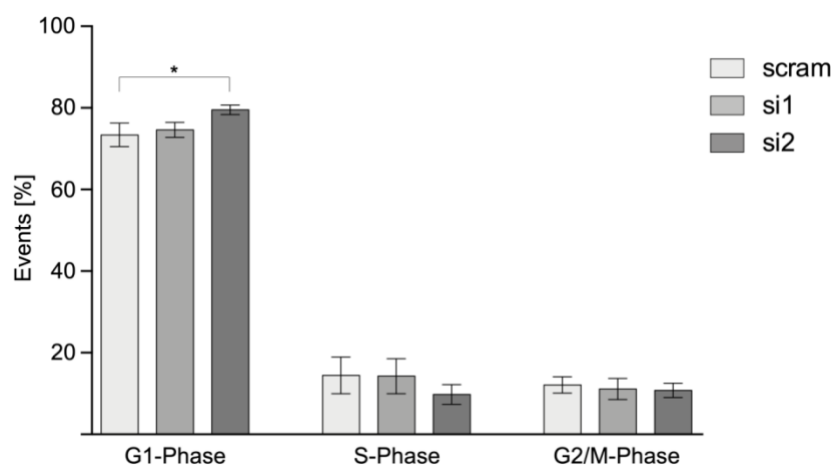


Abbildung 18: Einfluss von CDK11 Expression auf die Proliferation der ACHN Zelllinie. Die Proliferation der ACHN Zellen wurde 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) mittels BrdU durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

Der Großteil (ca. 80 %) aller ACHN Zellen befinden sich in der G1-Phase, wobei die CDK11 Expression hier keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen auszuüben scheint. Jedoch befinden sich signifikant nach Transfektion mit CDK11 siRNA 2 mehr Zellen in der G1-Phase ($p = 0,0262$) und tendenziell weniger Zellen in der S-Phase.

Abbildung 19 zeigt die Verteilung unterschiedlich transfizierten 786-O Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase.

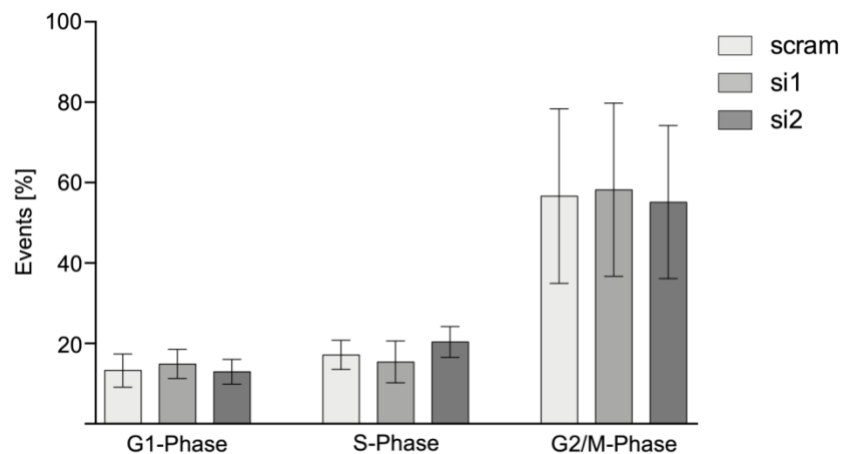


Abbildung 19: Einfluss von CDK11 Expression auf die Proliferation der 786-O Zelllinie. Die Proliferation der 786-O Zellen wurde 72 h nach Behandlung mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) mittels BrdU durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

Die 786-O Zellen befinden sich größtenteils in der G2/M-Phase. Auch hier ist die CDK11 Expression nicht ausschlaggebend für die Verteilung der Zellen. Innerhalb der einzelnen Phasen können keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit CDK11-spezifischer siRNA transfizierter Zellen und denen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, beobachtet werden.

Die folgende Abbildung fasst die Verteilung der unterschiedlich transfizierten 769-P Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase zusammen.

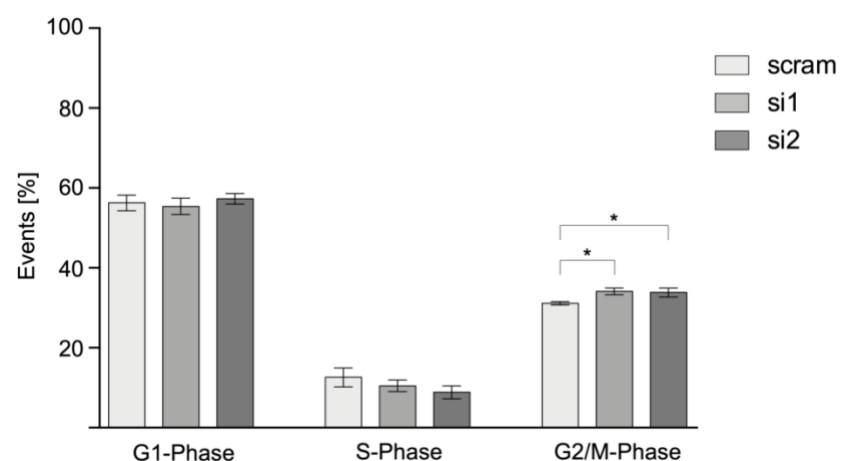


Abbildung 20: Einfluss von CDK11 Expression auf die Proliferation der 769-P Zelllinie. Die Proliferation der 769-P Zellen wurde 72 h nach Behandlung mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) mittels BrdU durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

Die 769-P Zellen reichern sich vor allem in der G1-Phase an. Die CDK11 Expression scheint hierbei für die Verteilung der Zellen nicht ausschlaggebend zu sein. Auch in der G2/M-Phase konnten in allen drei Zelllinien mehr Events detektiert werden. Hierbei gibt es eine signifikante Erhöhung der Zellzahlen von den beiden mit CDK11-spezifischer siRNA behandelten Zellen verglichen zu den mit unspezifischer siRNA behandelten Kontrollzellen ($p_{si1} = 0,0107$, $p_{si2} = 0,0164$). Weiterhin befinden sich in der S-Phase tendenziell weniger Zellen, die einen CDK11 Knockdown aufweisen.

Die CDK11 Expression scheint die Proliferation in allen 3 Zelllinien kaum zu beeinflussen.

4.6 Einfluss der CDK11 Expression auf den zytotoxischen Effekt verschiedener Substanzen

In diesem Versuch wurde untersucht, ob eine verminderte CDK11 Expression einen sensitivierenden Effekt auf unterschiedliche Therapeutika hat. Hierfür wurden die NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P mit den beiden konventionellen Therapeutika Sunitinib und Everolimus, sowie dem bisher nur experimentell genutzten Therapeutikum ABT-737 behandelt.

ABT-737 wird zu den niedermolekularen Arzneimitteln gezählt und kann durch die Bindung an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w Apoptose induzieren [37].

Der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib ist zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen [2]. Durch die Hemmung der Rezeptor-Tyrosinkinasen und aller damit verbundenen *down stream* Effekte werden Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasenbildung inhibiert.

Everolimus findet als Ausweichpräparat beim metastasierten Nierenzellkarzinom Verwendung [25]. Das Rapamycin-Derivat bindet an mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), wodurch dieses Protein inaktiviert wird und keine weiteren Proteinkomplexe bilden kann. Als Folge dieser Inhibition sind die Signaltransduktionswege des beiden Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 und damit verbunden die Transkription und Translation einiger Proteine verhindert [151].

Die ACHN Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 48 h nach Transfektion mit den Substanzen ABT-737, Sunitinib und Everolimus für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. In Tabelle 12 sind die Substanzen mit Konzentrationsangabe zusammengefasst.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Substanzen für den KV Assay mit eingesetzter Konzentration

Substanz	Konzentration [μM]
ABT-737	0,56
	2,78
	5,56
Sunitinib	0,50
	1,00
	5,00
Everolimus	0,50
	1,00

Die folgende Abbildung zeigt die relative Anzahl der ACHN Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen ABT-737 Konzentrationen.

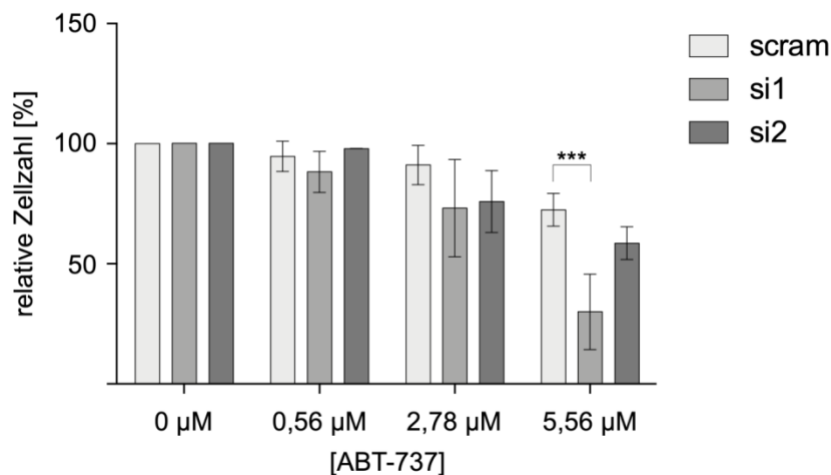


Abbildung 21: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der ACHN Zellen. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,56 μM , 2,78 μM bzw. 5,56 μM ABT-737 inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten (N=2 für [ABT-737]=0,56 μM) mit Standardfehler (***) $p < 0,001$.

Mit zunehmender ABT-737 Konzentration kann eine verminderte Zellzahl der mit si1 transfizierten Zellen beobachtet werden. Bei einer ABT-737 Konzentration von

5,56 μM ist die Anzahl diese Zellen signifikant reduziert, verglichen zu den Kontrollzellen ($p < 0,0001$).

In der folgenden Abbildung wird die relative Anzahl der ACHN Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Sunitinib Konzentrationen dargestellt.

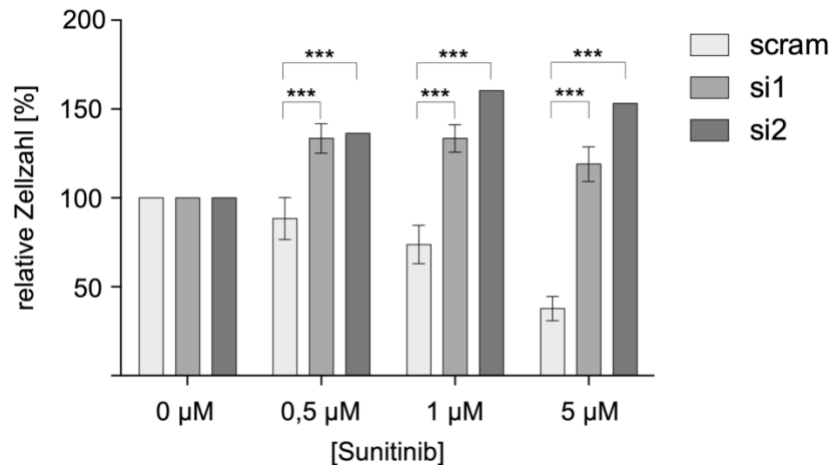


Abbildung 22: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der ACHN Zellen. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 μM , 1,0 μM bzw. 5,0 μM Sunitinib inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (***) ($p < 0,001$).

Bereits 0,5 μM Sunitinib führen in den ACHN Kontroll-Zellen (scram) zu einer hoch signifikanten Verminderung der Zellzahl, verglichen zu den beiden ACHN Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression. Diese deutliche Abweichung ist auch in den beiden höheren Konzentrationen zu beobachten.

In Abbildung 23 ist die relative Anzahl an ACHN Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Everolimus Konzentration zusammengefasst.

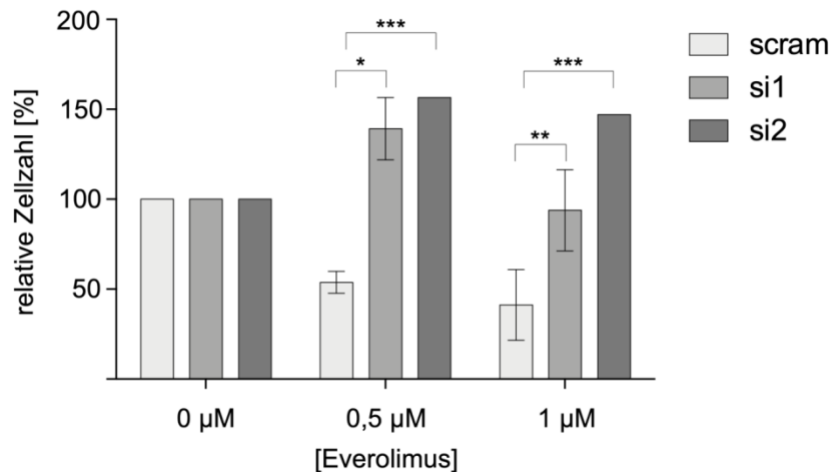


Abbildung 23: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der ACHN Zellen. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM bzw. 1,0 µM Everolimus inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten (si2: n = 1) mit Standardfehler (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Bereits 0,5 µM Everolimus führen in den ACHN Kontroll-Zellen (scram) zu einer signifikanten Verminderung der Zellzahl, verglichen zu den beiden ACHN Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression. Diese deutliche Abweichung ist auch bei der Behandlung mit 1 µM Everolimus zu sehen.

Die 786-O Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 48 h nach Transfektion mit den Substanzen ABT-737, Sunitinib und Everolimus für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. In Tabelle 12 sind die Substanzen mit Konzentrationsangabe zusammengefasst. In der folgenden Abbildung ist die relative Anzahl der 786-O Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen ABT-737 Konzentrationen dargestellt.

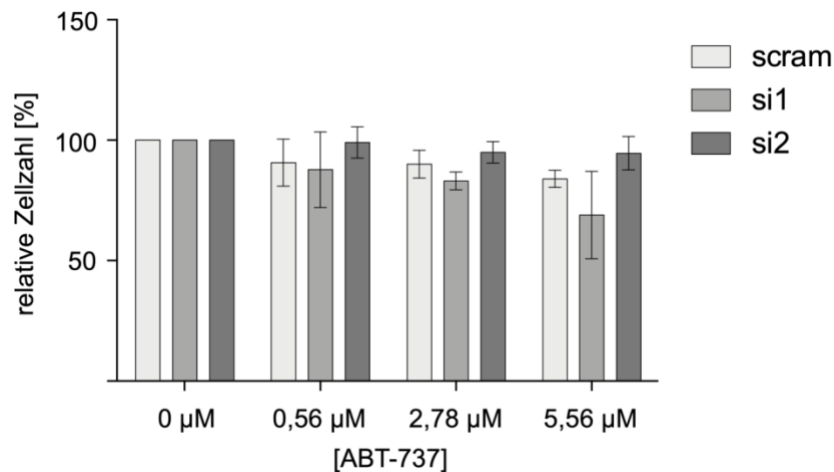


Abbildung 24: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 786-O Zellen. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,56 µM, 2,78 µM bzw. 5,56 µM ABT-737 inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Die Behandlung der 786-O Zellen mit 0,56 µM bzw. 2,78 µM ABT-737 zeigt keine eindeutigen Auswirkungen auf die Zellzahl. Bei einer ABT-737 Konzentration von 5,56 µM ist die Zellzahl der 786-O Zelllinie mit verminderter CDK11 Expression tendenziell etwas geringer als in der 786-O Kontroll-Zellen.

Abbildung 25 zeigt die relative Zellzahl der 786-O Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Sunitinib Konzentrationen.

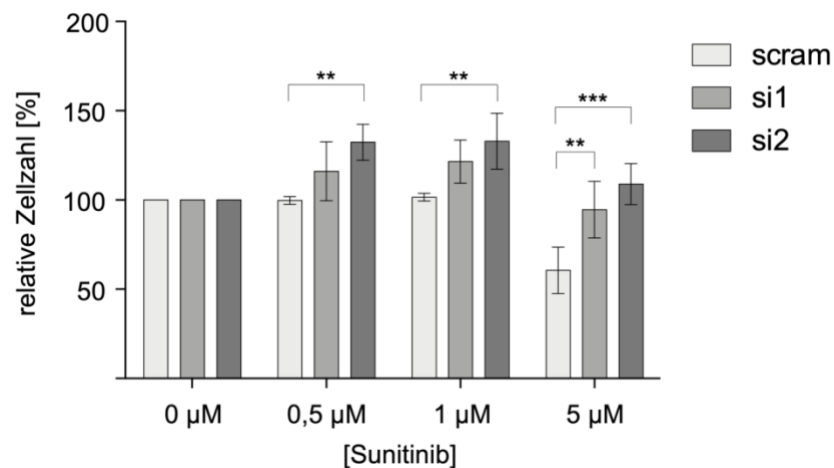


Abbildung 25: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 786-O Zellen. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) behandelt und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM, 1,0 µM bzw. 5,0 µM Sunitinib inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Die relative Zellzahl nimmt in den beiden Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression tendenziell zu, wohingegen die relative Zellzahl in den Kontroll-Zellen (scram) vor allem bei einer Sunitinib Konzentration von 5 µM abnimmt. Dabei ist

unabhängig von der Sunitinib Konzentration die Zellzahl in den Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression (si2, si1 ab 5 μM Sunitinib) signifikant erhöht.

In der folgenden Abbildung ist die relative Zellzahl der 786-O Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Everolimus Konzentrationen dargestellt.

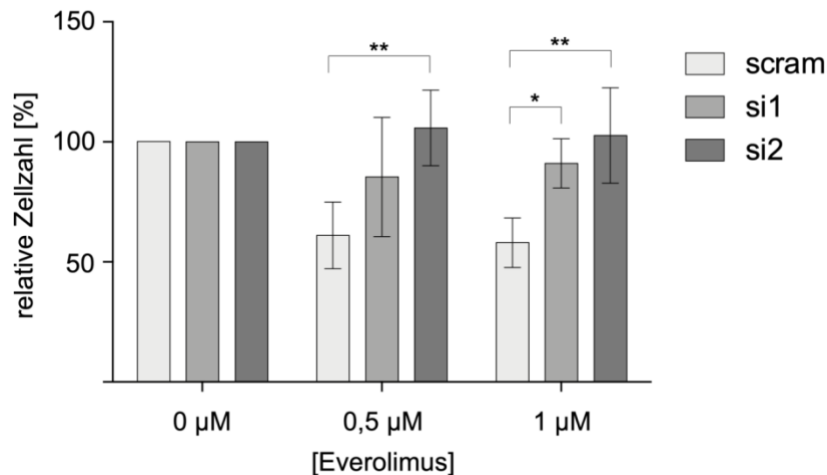


Abbildung 26: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 786-O Zellen. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) behandelt und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 μM bzw. 1,0 μM Everolimus inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die relative Zellzahl in den beiden Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression bleibt nahezu unverändert, wohingegen die relative Zellzahl in den Kontroll-Zellen (scram) bereits bei einer Konzentration von 0,5 μM Everolimus abnimmt. Dabei ist unabhängig von der Everolimus Konzentration die Zellzahl in den diesen Zelllinien signifikant niedriger als in den beiden 786-O Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression.

Die 769-P Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 24 h nach Transfektion mit den Substanzen ABT-737, Sunitinib und Everolimus für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. In Tabelle 12 sind die Substanzen mit Konzentrationsangabe zusammengefasst. In der folgenden Abbildung ist die relative Anzahl der 769-P Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen ABT-737 Konzentrationen dargestellt.

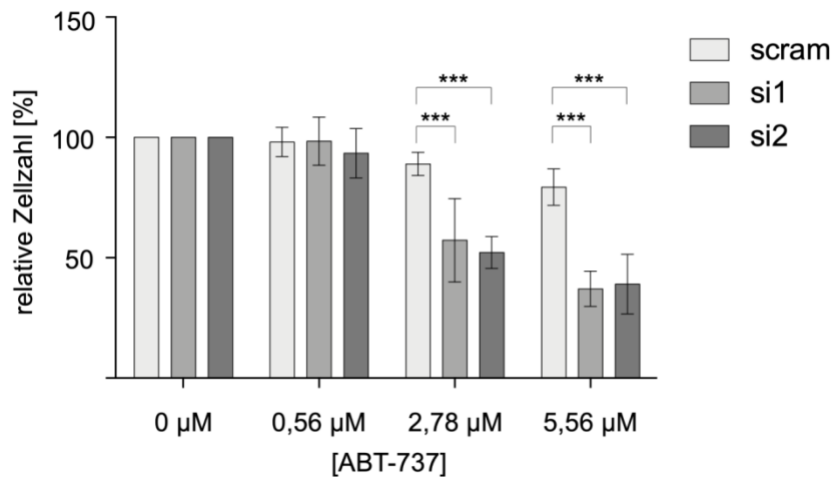


Abbildung 27: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 769-P Zellen. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 24 h später für weitere 72 h mit 0,56 µM, 2,78 µM bzw. 5,56 µM ABT-737 inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (***) $p < 0,001$).

In den beiden Zelllinien mit geringer CDK11 Expression ist ab einer Konzentration von 2,78 µM ABT-737 eine hochsignifikante Reduktion der Zellzahl zu beobachten. Während sich die Zellzahl der Kontrollzellen bei einer ABT-737 Konzentration von 5,56 µM um etwa 20 % verringert, ist die Zellzahl in den beiden Zelllinien mit verminderter CDK11 Expression um mehr als 50 % reduziert.

Die Abbildung 28 fasst die Ergebnisse der mit Sunitinib behandelten 769-P Zellen zusammen. Dargestellt ist die relative Zellzahl in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Sunitinib Konzentrationen.

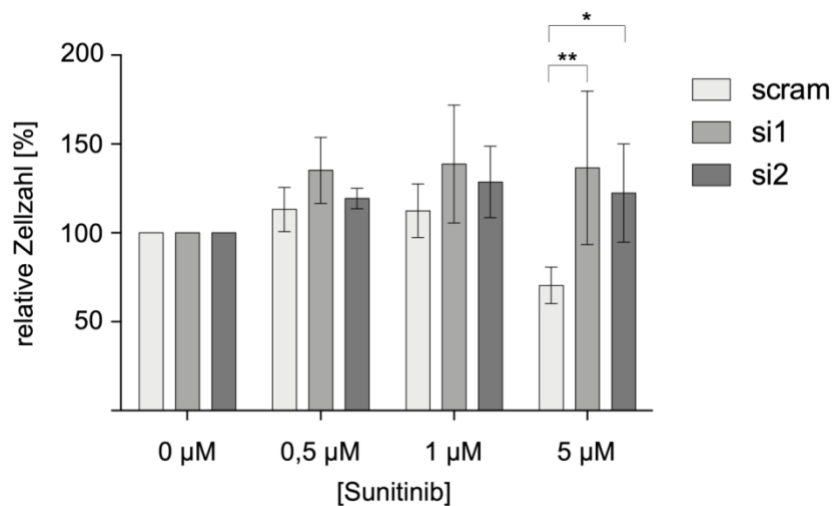


Abbildung 28: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 769-P Zellen. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) behandelt und 24 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM, 1,0 µM bzw. 5,0 µM Sunitinib inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Erst ab einer Konzentration von 5 µM Sunitinib können signifikante Unterschiede zwischen den mit unspezifischer siRNA (scram) und mit CDK11-spezifischer siRNA (si1 und si2) behandelter 769-P Zellen beobachtet werden. Hierbei ist die Zellzahl in den CDK11 knockdown Zellen signifikant höher als in den Kontrollzellen. Während die Anzahl dieser Zellen geringer wird, nimmt die Anzahl der beiden anderen Zellen tendenziell zu.

In der folgenden Abbildung ist die Auswirkung von Everolimus auf die 769-P Zellen mit und ohne verminderter CDK11 Expression zusammengefasst.

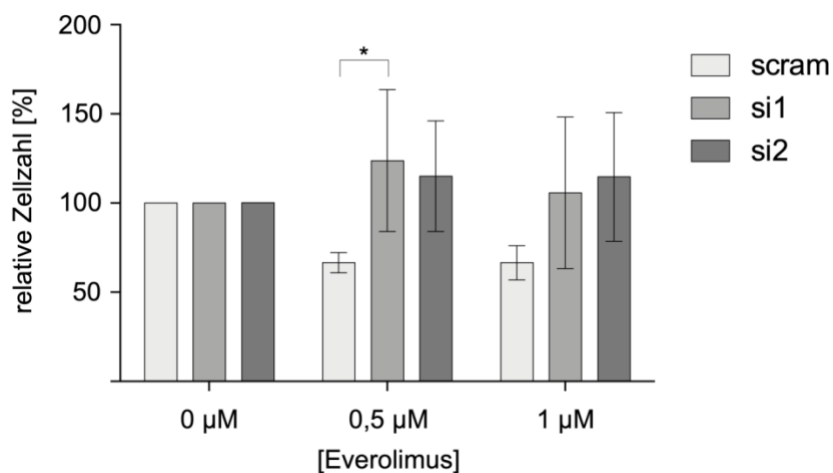


Abbildung 29: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 769-P Zellen. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 24 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM bzw. 1,0 µM Everolimus inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

Während die relative Zellzahl in den mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen um etwa 25 % abnimmt, nimmt die Anzahl der mit CDK11-spezifischer siRNA behandelten Zellen um knapp 25 % zu. Hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden 769-P Zelllinien zu beobachten.

Der CDK11 Knockdown führt in den drei NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber ABT-737, was sich durch eine deutliche Verminderung der relativen Zellzahl und somit der Viabilität bemerkbar macht. Daher soll im Folgenden untersucht werden, ob dieser Effekt auf eine erhöhte Apoptoseinduktion zurückzuführen ist.

4.7 Wirkung von ABT-737 auf NZK Zelllinien mit CDK11 Knockdown

In diesem Versuch wurde untersucht, inwiefern die CDK11 Expression einen Einfluss auf die Apoptose ausübt und ob der bei 4.6 beobachtete Effekt von ABT-737 zur erhöhten Apoptose-Rate führt. Dazu wurden die Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P 48 h nach Transfektion für weitere 24 h mit ABT-737 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und die Apoptose-Rate mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

In der folgenden Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Apoptoseuntersuchung der ACHN Zelllinie zusammengefasst. Dargestellt ist die Apoptose-Rate in Abhängigkeit der ABT-737 Konzentration.

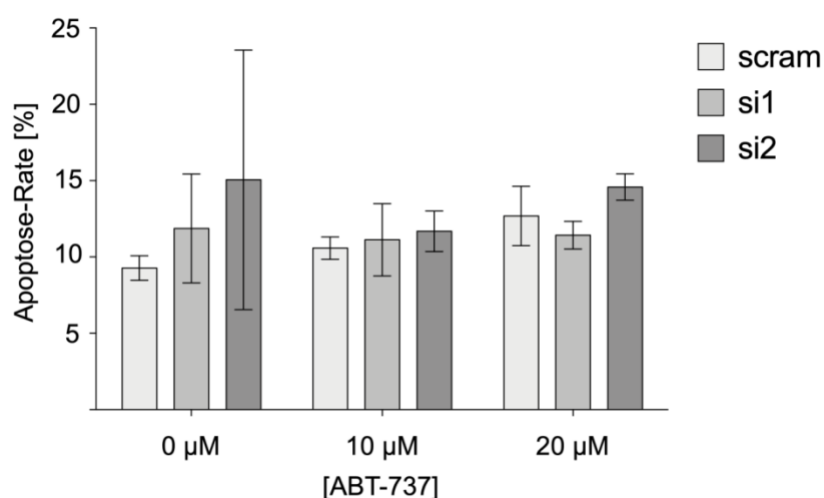


Abbildung 30: Apoptose-Rate von ACHN nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-737. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und die Apoptose-Rate nach Behandlung mit 10 µM bzw. 20 µM ABT-737 durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

In Abbildung 30 kann keine erhöhte oder erniedrigte Apoptose-Rate in den mit CDK11-spezifischer siRNA transfizierten Zellen verglichen zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden. Demnach scheint die CDK11 Expression in der ACHN Zelllinie keine Auswirkungen auf die Apoptose zu haben. Deutlich zu sehen ist jedoch, dass Zellen mit CDK11 Knockdown tendenziell eine höhere Apoptose-Rate aufweisen (vgl. 0 μ M ABT-737).

Die folgende Abbildung zeigt die Apoptose-Rate in der 786-O Zelllinie in Abhängigkeit der ABT-737 Konzentration.

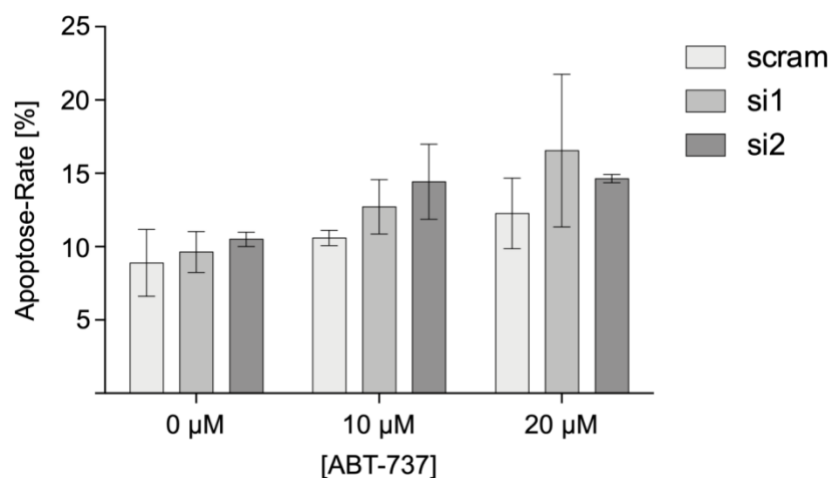


Abbildung 31: Apoptose-Rate von 786-O nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-737. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und die Apoptose-Rate nach Behandlung mit 10 μ M bzw. 20 μ M ABT-737 durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Mit erhöhter ABT-737 Konzentration nimmt auch die Apoptose-Rate in allen Zelllinien tendenziell zu. Jedoch können keine durch CDK11 Expression bedingte signifikante Unterschiede beobachtet werden. Auch diese Zellen zeigen unter CDK11 Knockdown ohne ABT-737 Behandlung tendenziell eine höhere Apoptose-Rate.

In Abbildung 32 ist die Apoptose-Rate der 769-P Zelllinie in Abhängigkeit der ABT-737 Konzentration dargestellt.

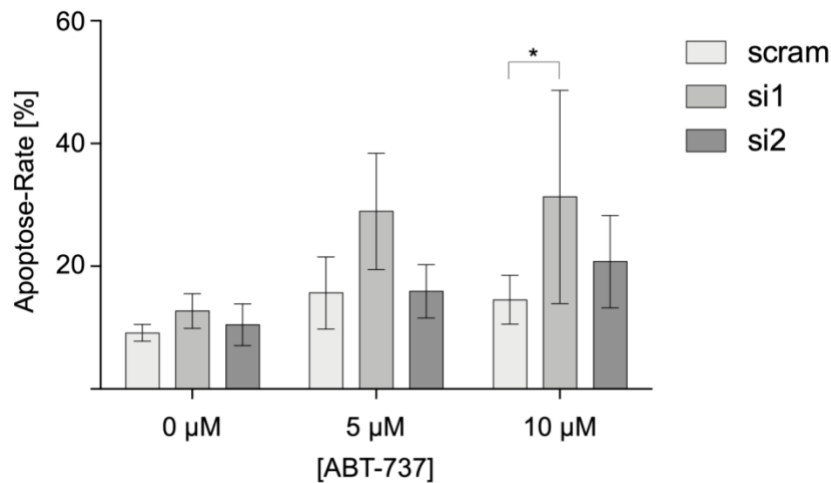


Abbildung 32: Apoptose-Rate von 769-P nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-737. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer CDK11-spezifischen siRNA (si1 und si2) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und die Apoptose-Rate nach Behandlung mit 5 µM bzw. 10 µM ABT-737 durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

Mit erhöhter ABT-737 Konzentration nimmt auch die Apoptose-Rate in allen Zelllinien zu. Bereits mit einer ABT-737 Konzentration von 5 µM ist eine deutliche Tendenz zu beobachten: 769-P Zellen mit verringerter CDK11 Expression weisen eine höhere Apoptose-Rate auf als 769-P Zellen mit normaler CDK11 Expression. Dieser Unterschied wird bei einer ABT-737 Konzentration von 10 µM signifikant ($p = 0,0407$).

In allen drei NZK Zelllinien war die Apoptose in den mit CDK11-spezifischer siRNA transfizierten Zellen tendenziell höher als in den Zellen mit normaler CDK11 Expression. Die Behandlung mit ABT-737 hat diese Neigung in den 769-P Zellen signifikant erhöht gegenüber den Kontroll-Zellen. Hier konnte auch der stärkste zytotoxische Effekt von ABT-737 beobachtet werden.

Aufgrund der tendenziell höheren Apoptoseneigung der CDK11 Knockdown Zellen wurde als nächstes die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen untersucht.

4.8 Einfluss der CDK11 Expression auf die Apoptose

Um zu untersuchen, inwiefern CDK11 die Apoptose reguliert, wurde die Expression einiger pro- und anti-apoptotischer Proteine mittels Immunoblot analysiert. In Tabelle 13 sind diese Proteine kurz zusammengefasst [152].

Tabelle 13: Zusammenfassung der Apoptose regulierenden Proteine

Protein	Wirkung
Mcl-1	anti-apoptotisch
Bcl-xL	anti-apoptotisch
Bcl-2	anti-apoptotisch
Bim	pro-apoptotisch
Bak	pro-apoptotisch
Bax	pro-apoptotisch

Abbildung 33 zeigt einen repräsentativen Western Blot der Expression der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1, Bcl-xL und Bcl-2 in Abhängigkeit der CDK11 Expression.

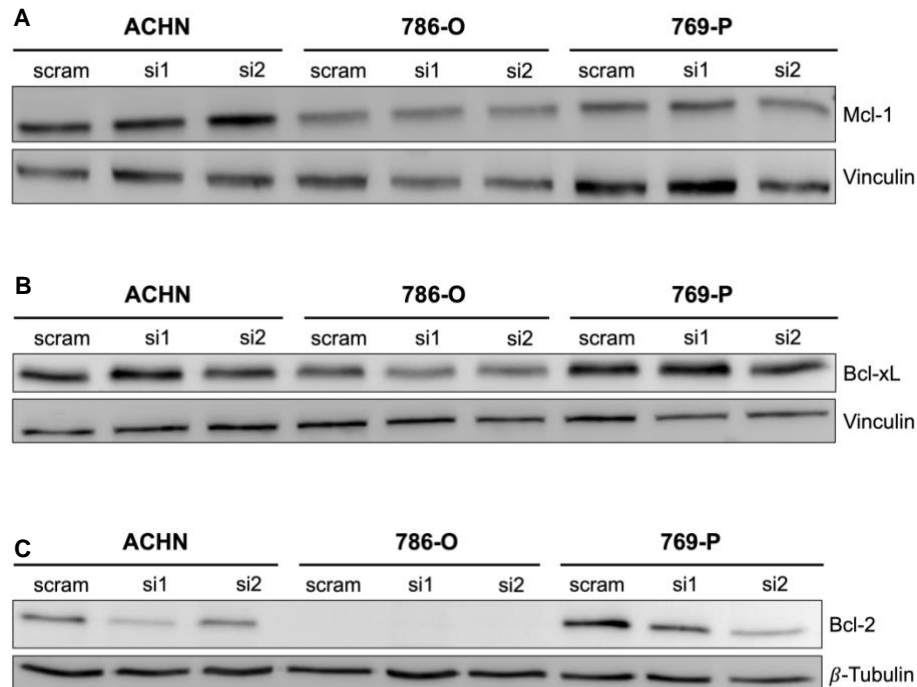


Abbildung 33: Immunoblot-Analyse der (A) Mcl-1, (B) Bcl-xL und (C) Bcl-2 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem (A+C) 10 %igen und (B) 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Mcl-1 unterliegt keiner CDK11 abhängigen Regulation (Abbildung 33A), Bcl-xL zeigt eine geringe Verminderung in den 786-O Knockdown-Zellen (Abbildung 33B). Bei den ACHN bzw. 769-P Zellen zeigt sich keine Veränderung. Das Protein Bcl-2 ist in den beiden Zelllinien ACHN und 769-P deutlich geringer exprimiert, verglichen zu den jeweiligen Kontroll-Zellen mit regulärer CDK11 Expression. Die 786-O Zellen exprimieren kein Bcl-2.

Die folgende Abbildung 34 fasst die repräsentativen Western Blots der Expression der pro-apoptotischen Proteine Bim, Bak und Bax in Abhängigkeit der CDK11 Expression zusammen.

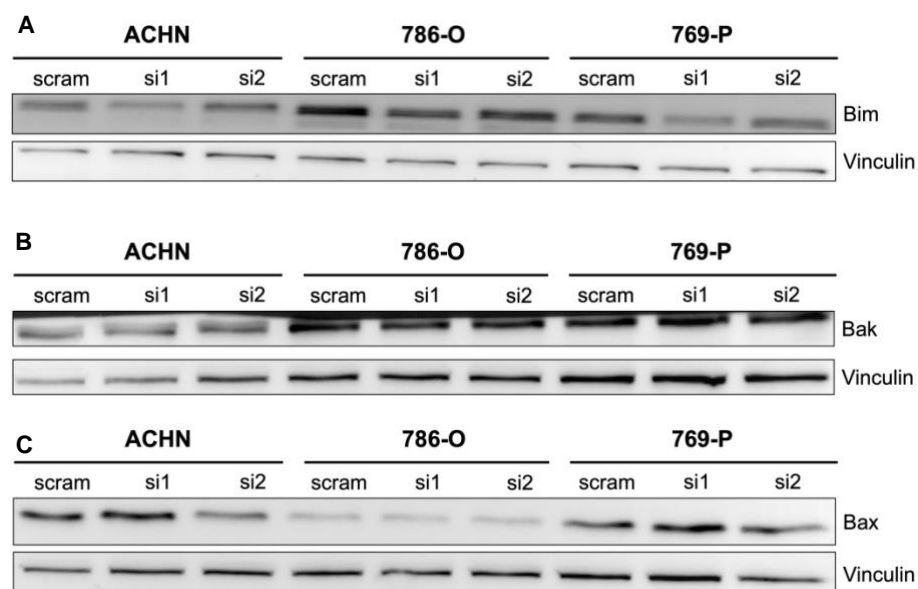


Abbildung 34: Immunoblot-Analyse der (A) Bim, (B) Bak und (C) Bax Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Die Expression von Bim in den ACHN Zellen (Abbildung 34A) ist in den mit CDK11-spezifischer siRNA transfizierten Zellen etwas erniedrigt. Dieser Trend ist auch in den 769-P Zelllinien zu beobachten: auch hier zeigen die Zellen mit verminderter CDK11 Expression ebenfalls eine verminderte Bim Expression. In den 786-O Zellen kann kein Effekt beobachtet werden.

Die beiden Proteine Bak und Bax (Abbildung 34B und 34C) zeigen keine Unterschiede in den Expressionen.

4.9 Einfluss der CDK11 Expression auf die Autophagie

Ferner wurde untersucht, ob eine verminderte CDK11 Expression den autophagischen Flux der NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P beeinflusst. Hierfür wurden die Expression der beiden Autophagiemarker LC3 und p62 untersucht [153]. In der folgenden Abbildung 35 ist ein repräsentativer Blot der LC3 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression gezeigt.

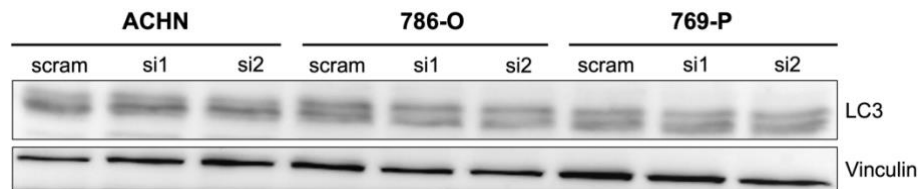


Abbildung 35: Immunoblot-Analyse der LC3 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Die Expression von LC3 zeigt keine Regulation durch CDK11. In allen Zelllinien ist die LC3 Expression ähnlich hoch.

Der repräsentative Blot der p62 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression ist in Abbildung 36 zusammengefasst.

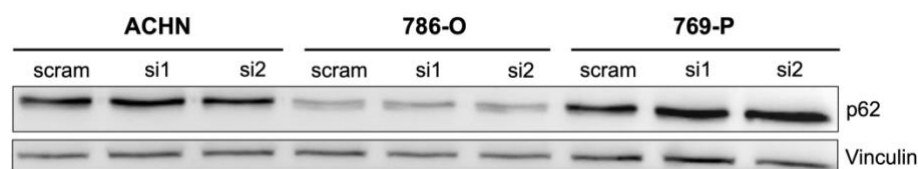


Abbildung 36: Immunoblot-Analyse der p62 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Auch die Expression von p62 zeigt in allen drei Zelllinien keine klare Regulation durch CDK11.

Die Expression von CDK11 steht somit in keinem direkten Zusammenhang mit den beiden Autophagiemarkern LC3 und p62.

4.10 Einfluss von CDK11 Expression auf den Zellzyklus

Da CDK11 unter anderem bei der Zellzykluskontrolle eine wichtige Rolle spielt, wurde in diesem Versuch untersucht, ob auch die Expression von weiteren für den Zellzyklus wichtigen Proteinen durch CDK11 reguliert werden.

In Abbildung 37 wird ein repräsentativer Blot der p21 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression gezeigt. P21 ist ein Protein mit zellzyklusinhibitorischen Eigenschaften [154].

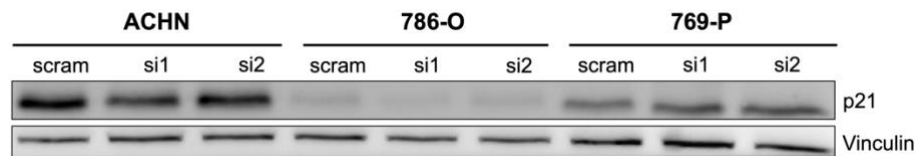


Abbildung 37: Immunoblot-Analyse der p21 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Betrachtet man die Expression von p21 in den Zellen mit physiologischer CDK11 Expression mit den Zellen, in denen die CDK11 Expression vermindert ist, so stellt man fest, dass p21 keiner Regulation durch CDK11 unterliegt.

Die Abbildung 38 zeigt einen repräsentativen Blot der E2F1 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression.

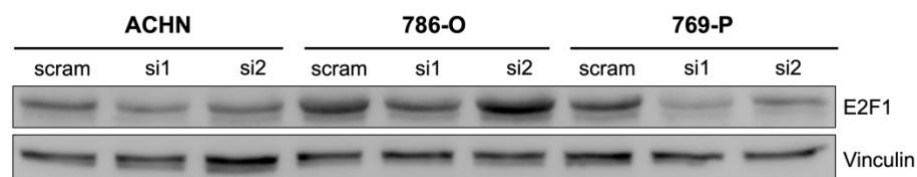


Abbildung 38: Immunoblot-Analyse der E2F1 Expression in Abhängigkeit der CDK11 Expression. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In den ACHN Zellen kann man in den mit CDK11-spezifischer siRNA transfizierten Zellen eine geringere Expression von E2F1 beobachtet werden. In den 769-P Zellen ist dieser Trend noch deutlicher zu sehen. Demnach scheint hier das Fehlen von CDK11 eine Auswirkung auf die E2F1 Expression zu haben, nämlich eine ebenfalls reduzierte Expression.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P für die folgenden Versuche ein E2F1 Knockdown durchgeführt und die Einflüsse der E2F1 Expression auf Zellwachstum, verschiedene Signalwege und die Sensibilisierung gegenüber bestimmten Therapeutika untersucht.

4.11 Reduzierte E2F1 Expression im NZK mittels siRNA

Die E2F1 Expression in den NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P wurde mittels siRNA moduliert. Hierfür wurden die Zellen nach 3.2.1.4 beschrieben entweder mit einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA mit Hilfe von Lipofectamin transfiziert und 48 h später lysiert. Anschließend wurden 30 µg Protein auf einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und mittels Immunoblot-Analyse untersucht. In Abbildung 39 ist ein repräsentativer Western Blot des E2F1 Knockdowns aus in den Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P gezeigt (n = 3).

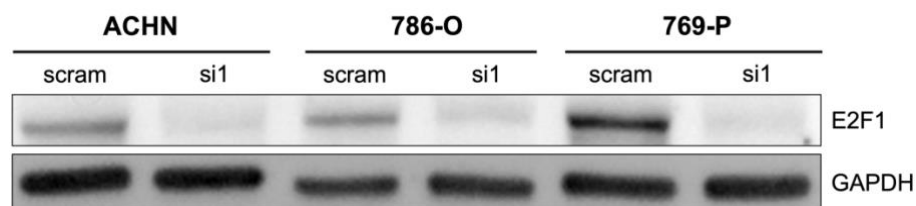


Abbildung 39: Immunoblot-Analyse des E2F1 Knockdowns: Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In allen drei Zelllinien ist eine verminderte E2F1 Expression nach erfolgreicher Transfektion mit E2F1-spezifischer siRNA (si1) zu sehen. Die Kontrolle mit unspezifischer siRNA zeigt hingegen eine hohe E2F1 Expression, diese ist in den 769-P Zellen deutlich höher als in den anderen beiden NZK Zelllinien.

4.12 Einfluss der E2F1 Expression auf das Zellwachstum

In diesem Versuch wurde untersucht, wie sich die Expression von E2F1 auf das Zellwachstum auswirkt. Dazu wurden die Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P mit E2F1-spezifischer siRNA (si1), sowie einer Kontroll-siRNA durch Lipofektion transfiziert und ausgesät. Nach 48 h und 72 h wurde die Zellzahl mit Hilfe des CASY-Zellzählersystems ermittelt.

Der Einfluss der E2F1 Expression auf das Wachstum der ACHN Zellen ist in Abbildung 40 dargestellt, wobei die Anzahl vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion gezeigt wird.

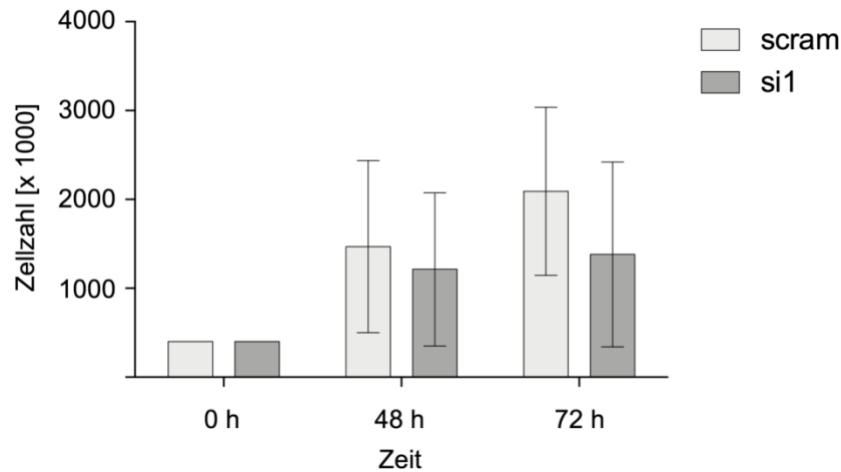


Abbildung 40: Auswirkungen der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der ACHN Zelllinie. Die Zellzahl der ACHN Zellen wurde 48 h und 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 400.000 Zellen ausgesät. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Nach 48 h ist die Anzahl der ACHN Zellen mit einer verminderten E2F1 Expression tendenziell geringer als die der ACHN Zellen mit regulärer E2F1 Expression. Diese Tendenz wird nach 72 h noch deutlicher.

In der folgenden Abbildung ist der Einfluss der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der 786-O Zellen dargestellt, wobei die Anzahl vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion gezeigt wird.

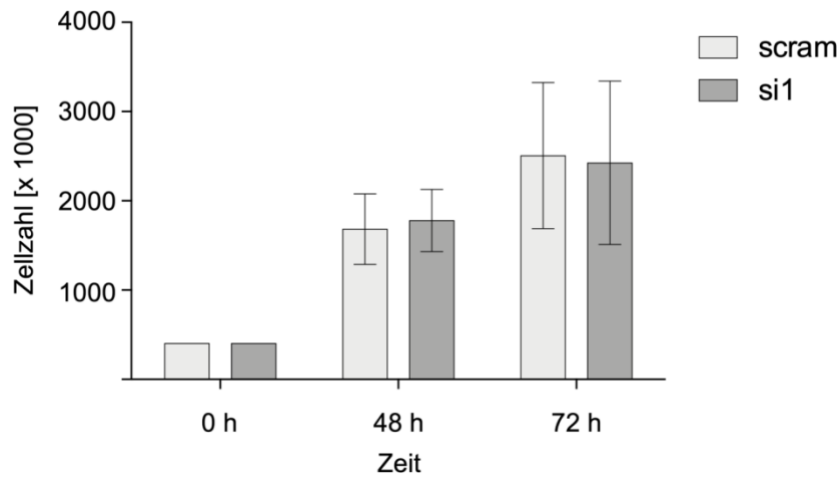


Abbildung 41: Auswirkungen der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der 786-O Zelllinie. Die Zellzahl der 786-O Zellen wurde 48 h und 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 400.000 Zellen ausgesät. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Zu keinem Zeitpunkt können Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden. Die E2F1 Expression scheint in den 786-O Zellen keinen Einfluss auf die Proliferationsrate zu haben.

In Abbildung 42 ist der Einfluss der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der 769-P Zellen zusammengefasst. Gezeigt ist die Anzahl vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion.

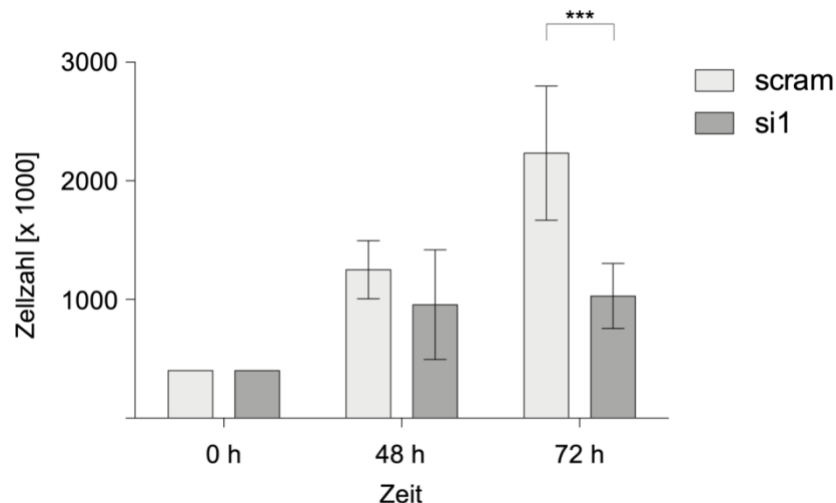


Abbildung 42: Auswirkungen der E2F1 Expression auf das Zellwachstum der 769-P Zelllinie. Die Zellzahl der 769-P Zellen wurde 48 h und 72 h nach Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 400.000 Zellen ausgesät. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (***) $p = 0,001$.

Nach 48 h ist die Anzahl der 769-P Zellen mit einer verminderten E2F1 Expression tendenziell geringer als die der 769-P Zellen mit regulärer E2F1 Expression. Diese Beobachtung wird nach 72 h hochsignifikant: während sich die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen fast verdoppeln, wird die Zellzahl in den mit E2F1-spezifischer siRNA transfizierten Zellen kaum höher.

Da in Abbildung 39 gezeigt werden konnte, dass 769-P Zellen die höchste E2F1 Expression aufweisen, war zu erwarten, dass ein Knockdown dieses Proteins die 769-P Zellen am stärksten beeinflussen kann.

In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob dieser Effekt einer geringeren Proliferation oder einer erhöhten Apoptose-Neigung zugeschrieben werden kann.

4.13 Einfluss der E2F1 Expression auf unterschiedliche Signalwege

Wie auch in den vorangegangenen Experimenten mit CDK11 Knockdown soll in diesem Versuch auf Proteinebene untersucht werden, welche Auswirkungen eine verminderte E2F1 Expression auf bestimmte Signalwege hat. Hierzu wurden die ACHN, 786-O und 769-P Zellen wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 48 h später lysiert. Anschließend wurden 30 µg Protein auf einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und mittels Immunoblot-Analyse untersucht.

In der folgenden Abbildung 43 wird ein repräsentativer Western Blot der die Expressionspiegel von AKT und dessen Phosphoform in Abhängigkeit der E2F1 Expression gezeigt (n = 3).

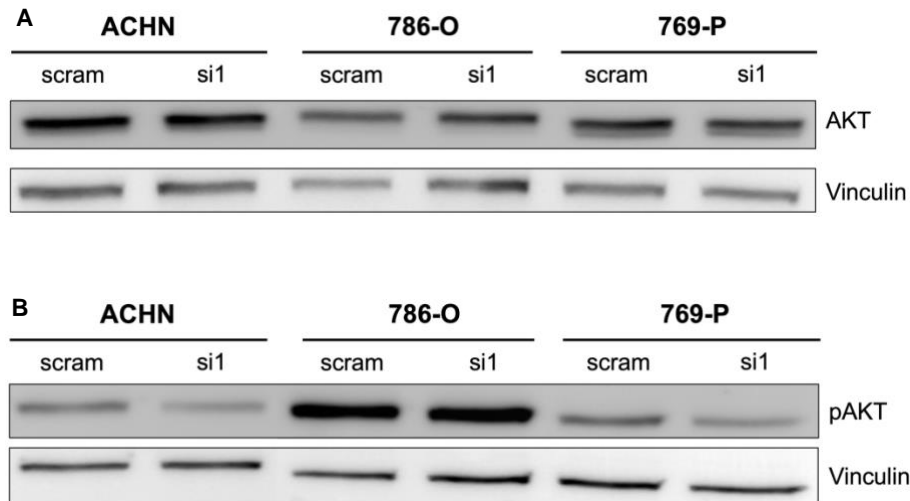


Abbildung 43: Immunoblot-Analyse der (A) AKT und (B) pAKT Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In allen drei Zelllinien ist kein Unterschied in der AKT Expression zu beobachten (Abbildung 43A). Die Phosphorylierung von AKT ist in den Zelllinien ACHN und 769-P in den Zellen mit verminderter E2F1 Expression niedriger.

Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der p70-S6-Kinase Expression und dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit der E2F1 Expression.

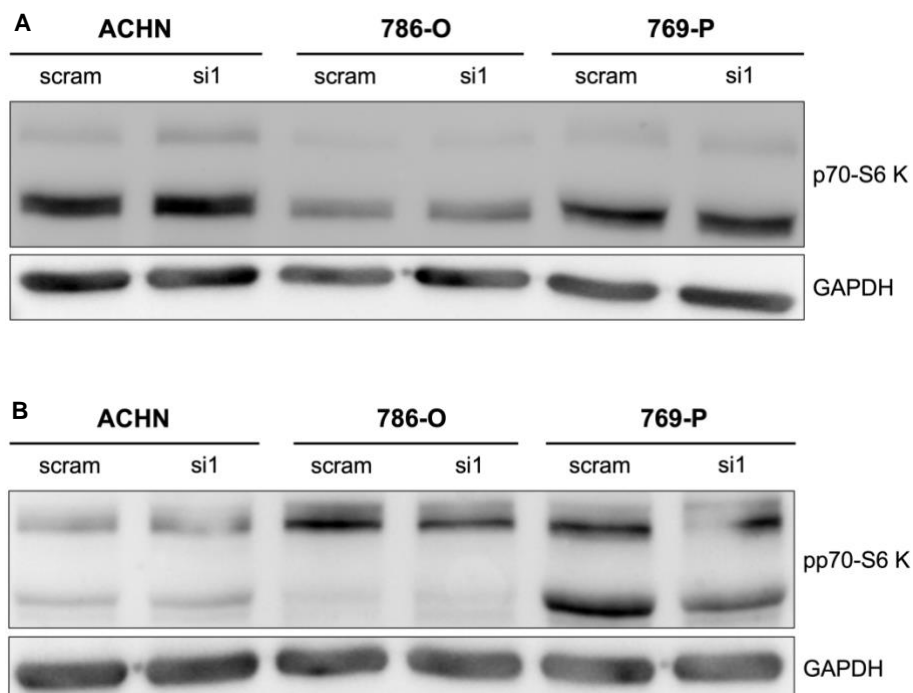


Abbildung 44: Immunoblot-Analyse der (A) p70-S6-Kinase und (B) pp70-S6-Kinase Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In der Expression von p70-S6-Kinase können keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Abhängigkeit von der E2F1 Expression beobachtet werden (Abbildung 44A). Die Phosphorylierung der p70-S6-Kinase scheint in der 769-P Zelllinie geringer zu sein, die Kontrollbedingung zeigt hier eine deutlich stärkere pp70-S6K Bande.

In Abbildung 45 ist ein repräsentativer Western Blot der S6-Kinase Expression und dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit der E2F1 Expression gezeigt.

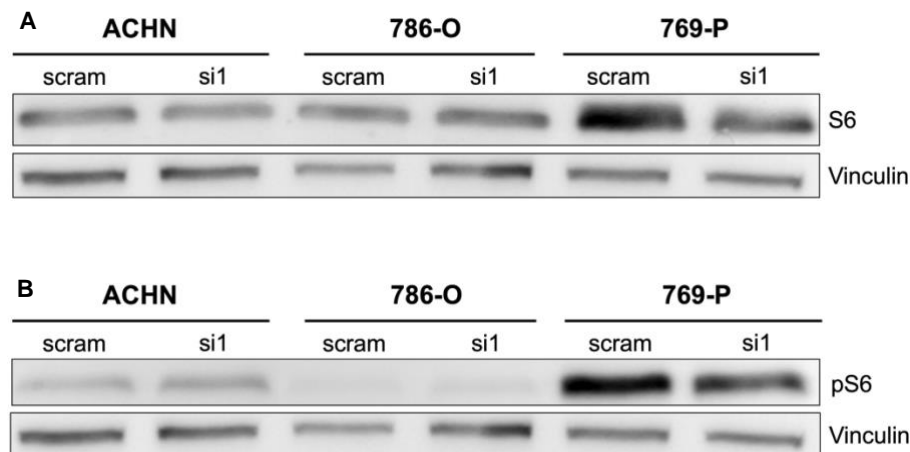


Abbildung 45: Immunoblot-Analyse der (A) S6-Kinase und (B) pS6-Kinase Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und 30 µg Protein auf einem 10 %igen SDS-Gel analysiert.

In den beiden Zelllinien ACHN und 786-O können keine Unterschiede in den S6 Expressionen und Phosphorylierungen beobachtet werden. Die 769-P Zelllinie zeigt eine reduzierte S6 Expression nach erfolgtem E2F1 Knockdown, auch die Phosphorylierung dieser Kinase wird durch eine geringere E2F1 Expression vermindert.

4.14 Einfluss der E2F1 Expression auf den zytotoxischen Effekt verschiedener Substanzen

In diesem Versuch wurde untersucht, ob eine verminderte E2F1 Expression einen sensitivierenden Effekt auf unterschiedliche Therapeutika hat. Hierfür wurden die NZK Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P mit den beiden konventionellen Therapeutika Sunitinib und Everolimus, sowie dem bisher nur experimentell genutzten Therapeutikum ABT-737 behandelt.

Die ACHN Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 24 h nach Transfektion mit den Substanzen ABT-737, Sunitinib und Everolimus für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. In Tabelle 12 sind die Substanzen mit Konzentrationsangabe zusammengefasst.

Die folgende Abbildung zeigt die relative Anzahl der ACHN Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen ABT-737 Konzentrationen.

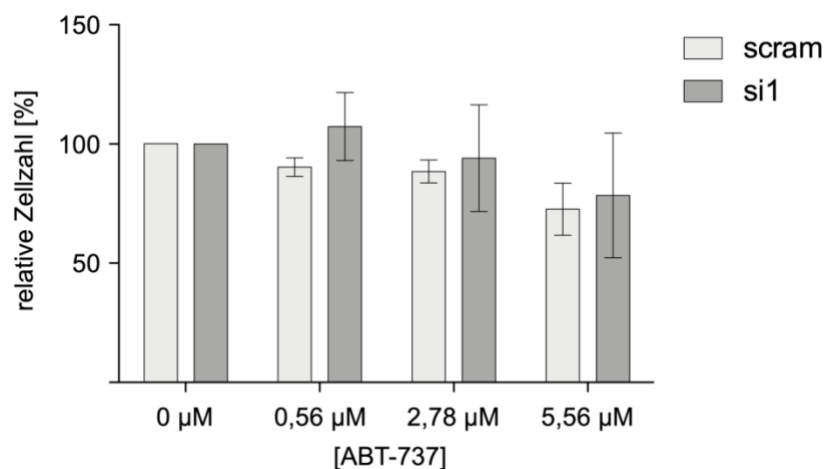


Abbildung 46: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der ACHN Zellen. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 24 h später für weitere 72 h mit 0,56 µM, 2,78 µM bzw. 5,56 µM ABT-737 inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

In Abbildung 46 ist zu beobachten, dass mit steigender ABT-737 Konzentration die Zellzahl in beiden Zelllinien etwas abnimmt. Hierbei weisen die ACHN Zellen, bei denen die E2F1 Expression vermindert ist, tendenziell höhere Zellzahlen auf.

In der folgenden Abbildung wird die relative Anzahl der ACHN Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Sunitinib Konzentrationen dargestellt.

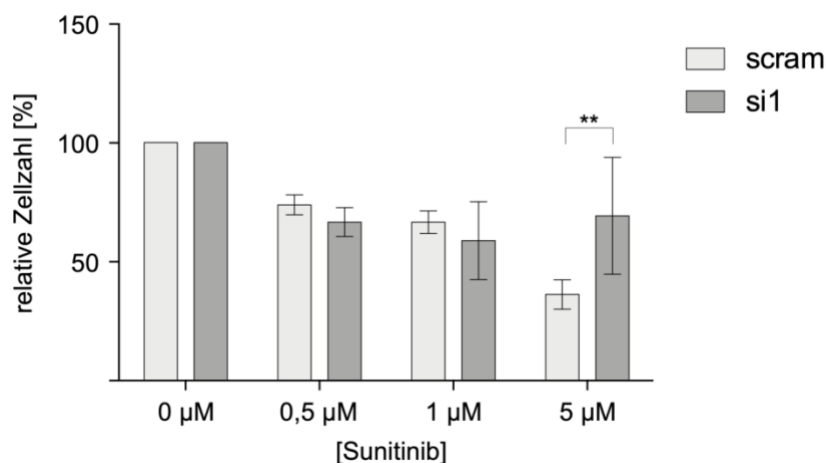


Abbildung 47: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der ACHN Zellen. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 24 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM, 1,0 µM bzw. 5,0 µM Sunitinib inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (** p < 0,01).

Mit zunehmender Sunitinib Konzentration nehmen in beiden ACHN Zelllinien die relativen Zellzahlen ab. Ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Zellen mit E2F1-reduzierter Expression und Kontrollzellen ist mit einer Sunitinib Konzentration von 5 µM zu beobachten. Hier ist die relative Zellzahl in E2F1 Knockdown Zellen etwa doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen, die eine reguläre E2F1 Expression aufweisen.

In Abbildung 48 ist die relative Anzahl an ACHN Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Everolimus Konzentration zusammengefasst.

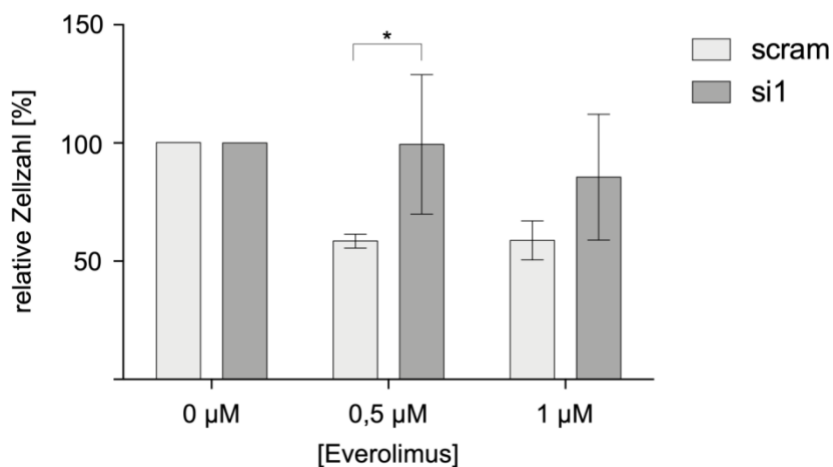


Abbildung 48: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der ACHN Zellen. Die ACHN Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 24 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM bzw. 1,0 µM Everolimus inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* p < 0,05).

In Abbildung 48 ist deutlich zu sehen, dass die Behandlung mit Everolimus in den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu einer starken Reduktion der relativen Zellzahl führt. Dieser Effekt ist in den mit E2F1-spezifischer siRNA transfizierten Zellen nicht zu beobachten. Mit 0,5 μM Everolimus kann hier bereits ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden ACHN Zelllinien beobachtet werden.

Die 786-O Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 48 h nach Transfektion mit den Substanzen ABT-737, Sunitinib und Everolimus für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. In Tabelle 12 sind die Substanzen mit Konzentrationsangabe zusammengefasst. In der folgenden Abbildung ist die relative Anzahl der 786-O Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen ABT-737 Konzentrationen dargestellt.

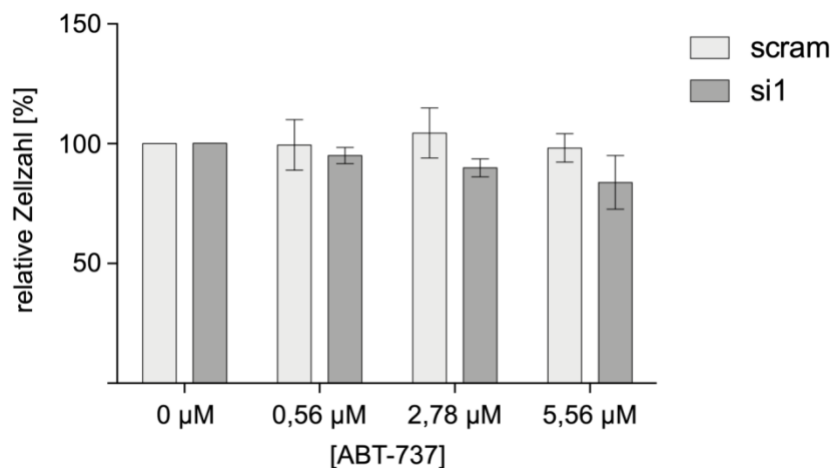


Abbildung 49: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 786-O Zellen. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,56 μM , 2,78 μM bzw. 5,56 μM ABT-737 inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

In Abbildung 49 kann durch die Inkubation der 786-O Zellen mit unterschiedlichen ABT-737 Konzentrationen keine signifikanten Reduktionen der relativen Zellzahlen beobachtet werden. Insgesamt scheinen diese Zellen kaum auf ABT-737 zu reagieren, auch die Zellen nicht, die eine verminderte E2F1 Expression haben.

Abbildung 50 zeigt die relative Zellzahl der 786-O Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Sunitinib Konzentrationen.

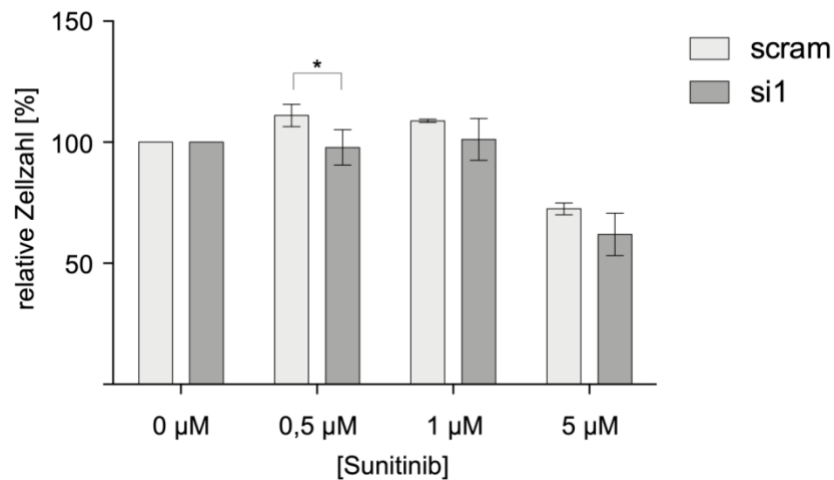


Abbildung 50: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 786-O Zellen. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM, 1,0 µM bzw. 5,0 µM Sunitinib inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

In den Konzentrationen 0,5 µM und 1,0 µM Sunitinib kann kein Einfluss auf die relative Zellzahl der 786-O Zellen beobachtet werden, verglichen mit Zellen ohne Sunitinibbehandlung (0 µM Sunitinib). Jedoch kann trotzdem eine signifikant geringere Zellzahl in den E2F1 Knockdown Zellen beobachtet werden, verglichen zu den Kontrollzellen mit regulärer E2F1 Expression. Bei einer Sunitinib Konzentration von 5 µM ist erstmals eine eindeutige Verminderung der relativen Zellzahl in beiden Zelllinien zu beobachten. Hier ist die Anzahl der mit E2F1-spezifischer siRNA behandelten Zellen tendenziell niedriger als die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen.

In der folgenden Abbildung ist die relative Zellzahl der 786-O Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Everolimus Konzentrationen dargestellt.

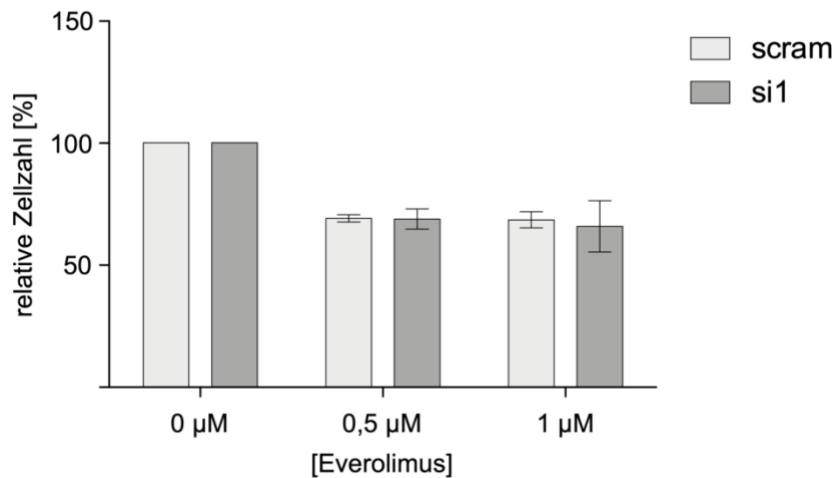


Abbildung 51: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 786-O Zellen. Die 786-O Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM, 1,0 µM bzw. 5,0 µM Everolimus inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

In Abbildung 51 ist deutlich, dass die Behandlung mit Everolimus in beiden Zelllinien zu einer verminderten relativen Zellzahl führt. Hierbei können zwischen den Kontrollzellen und den Zellen mit reduzierter E2F1 Expression keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Die 769-P Zellen wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben transfiziert und 48 h nach Transfektion mit den Substanzen ABT-737, Sunitinib und Everolimus für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. In Tabelle 12 sind die Substanzen mit Konzentrationsangabe zusammengefasst. In der folgenden Abbildung ist die relative Anzahl der 769-P Zellen in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen ABT-737 Konzentrationen dargestellt.

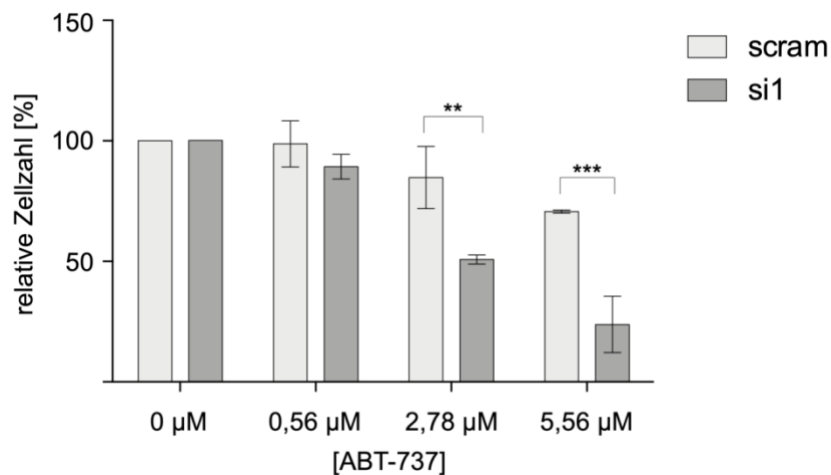


Abbildung 52: Wirkung von ABT-737 auf die Anzahl der 769-P Zellen. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,56 µM, 2,78 µM bzw. 5,56 µM ABT-737 inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (** p < 0,01, *** p < 0,001).

769-P Zellen mit reduzierter E2F1 Expression scheinen besonders stark auf eine Behandlung mit ABT-737 zu reagieren. Bereits bei einer Konzentration von 2,78 µM ABT-737 kann ein hoch signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen mit regulärer E2F1 Expression beobachtet werden. Diese Beobachtung ist mit einer ABT-737 Konzentration von 5,56 µM noch deutlicher zu sehen. Hier ist die Zellzahl um über 75 % niedriger als in denselben Zellen ohne ABT-737 Behandlung.

Die Abbildung 53 fasst die Ergebnisse der mit Sunitinib behandelten 769-P Zellen zusammen. Dargestellt ist die relative Zellzahl in Prozent in Abhängigkeit der zugegebenen Sunitinib Konzentrationen.

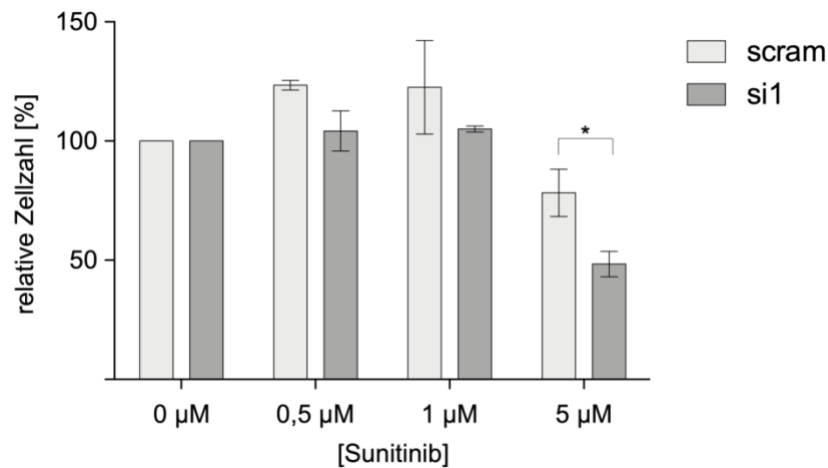


Abbildung 53: Wirkung von Sunitinib auf die Anzahl der 769-P Zellen. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 μM, 1,0 μM bzw. 5,0 μM Sunitinib inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (* $p < 0,05$).

In den Konzentrationen 0,5 μM und 1,0 μM Sunitinib kann kein Einfluss auf die relative Zellzahl der 769-P Zellen beobachtet werden, verglichen mit Zellen ohne Sunitinibbehandlung (0 μM Sunitinib). Bei der Behandlung mit 5 μM Sunitinib weisen die 769-P Zellen mit verminderter E2F1 Expression signifikant geringere Zellzahlen auf als die Kontroll-Zellen.

In der folgenden Abbildung ist die Auswirkung von Everolimus auf die 769-P Zellen mit und ohne verminderter E2F1 Expression zusammengefasst.

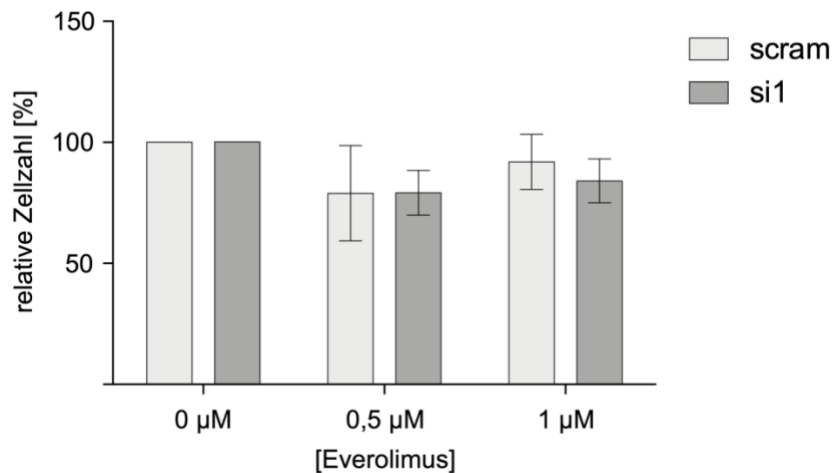


Abbildung 54: Wirkung von Everolimus auf die Anzahl der 769-P Zellen. Die 769-P Zellen wurden mit Lipofectamin™ 2000, 5 nM einer E2F1-spezifischen siRNA (si1) oder 5 nM einer unspezifischen siRNA (scram) transfiziert und 48 h später für weitere 72 h mit 0,5 µM bzw. 1,0 µM Everolimus inkubiert. Anschließend wurde mittels Kristallviolett-Färbung die relative Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

Tendenziell sind die relativen Zellzahlen durch die Gabe von Everolimus in beiden 769-P Zelllinien vermindert. Zwischen den Kontrollzellen und den Zellen mit reduzierter E2F1 Expression kann hierbei kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Auch in diesem Versuch sind die 769-P Zellen am stärksten von einer verminderten E2F1 Expression in ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen zytotoxischen Substanzen betroffen. Vor allem eine Behandlung mit ABT-737 zeigt einen starken Effekt in 769-P Zellen mit E2F1 Knockdown. Auch 5 µM Sunitinib hat eine signifikante Reduzierung der Zellvitalität zur Folge.

Um zu überprüfen, ob der E2F1 Knockdown in den betroffenen Zellen eine erhöhte Apoptose verursacht, wird im nächsten Versuch die Expression eines proapoptischen Proteins untersucht.

4.15 Einfluss der E2F1 Expression auf das pro-apoptotische Protein Bim

Bim wird zu den pro-apoptotischen Proteinen gezählt. In diesem Versuch wurde die Expression dieses Proteins in Abhängigkeit der E2F1 Expression untersucht. Abbildung 55 zeigt einen repräsentativen Western Blot.

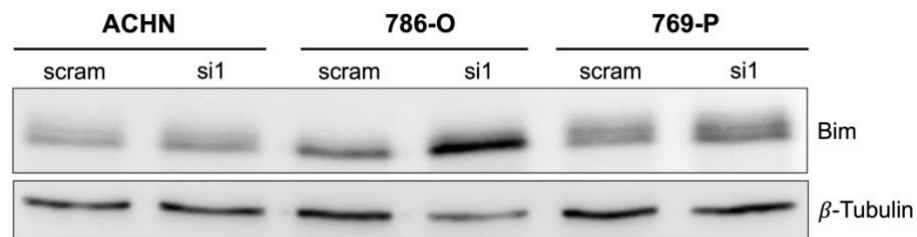


Abbildung 55: Immunoblot-Analyse der Bim Expression in Abhängigkeit der E2F1 Expression. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und 30 μ g Protein auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

In der ACHN Zelllinie kann kein Unterschied in der Bim Expression beobachtet werden. In den beiden Zelllinien 786-O und 769-P ist die Bim Expression in mit E2F1-spezifischer siRNA transfizierten Zellen deutlich erhöht.

Dieses Ergebnis ist ein weiteres Indiz dafür, dass eine erhöhte Apoptose durch verminderte E2F1 Expression ursächlich für das geringere Zellwachstum sein könnte.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Cyclin abhängigen Kinase 11, sowie des Transkriptionsfaktors E2F1 im Nierenzellkarzinom-Modell untersucht. Dazu wurden jeweils mittels siRNA-Oligonukleotiden Lipofectamin-vermittelt die Expressionsspiegel der beiden Proteine supprimiert. Anschließend wurde mit den in Kapitel 3 beschriebenen Methoden untersucht, inwiefern die Proliferation und Apoptose der Zellen hiervon beeinflusst werden. Darüber hinaus wurde der Frage einer veränderten Sensitivität gegenüber verschiedenen konventionellen und experimentellen Therapeutika nach Knockdown nachgegangen.

5.1 Expression von CDK11 im Nierenzellkarzinom

Die hohe CDK11 Expression in den untersuchten Zelllinien ACHN, 786-O und 769-P könnte darauf hindeuten, dass CDK11 im NZK eine für den Tumor vorteilhafte Funktion ausübt und wurde im Folgenden daher näher analysiert [75, 76]. Dazu wurde mithilfe von 2 CDK11-spezifischen siRNAs die Expression vermindert, was im Fall von ACHN und 769-P etwas deutlicher erkennbar wird als bei 786-O (Abbildung 8 und 9).

In der Folge wurde zunächst untersucht, welche Auswirkungen dies auf die Zell-Viabilität hat.

5.2 Viabilität in Abhängigkeit der CDK11 Expression

Bei der ACHN Zelllinie zeigt sich eine kontinuierliche Zunahme der Zellzahl im Fall der Kontroll-Zellen bis 72 h nach Transfektion. Im Vergleich dazu ist die Zellzahl nach Knockdown nach 48 h bzw. 72 h deutlich vermindert, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Möglicherweise wäre dies bei einem verlängertem Beobachtungszeitraum von bereits 96 h der Fall gewesen, denn die Effekte sind in beiden Fällen des Knockdowns annähernd gleich stark ausgeprägt und der Unterschied von den Kontroll-Zellen zu den Knockdown-Zellen nimmt von 48 h zu 72 h nach Transfektion deutlich zu (Abbildung 10).

Die Kontroll-Zellen bei der 786-O Zelllinie zeigen 72 h nach Transfektion eine tendenziell, wenn auch nicht signifikant, vermehrte Zunahme im Vergleich zu den Knockdown-Zellen. Auch hier wäre denkbar, dass ein signifikanter Zusammenhang

ein oder 2 Tage später erreicht worden wäre. Möglich wäre, wie bei den ACHN-Zelllinien, dass sich die Auswirkungen durch eine veränderte Proteinbiosynthese erst nach einigen Tagen bemerkbar machen und diese Effekte hier nicht aufgedeckt werden konnten (Abbildung 11).

Im Gegensatz dazu ist bei den 769-P Zellen 72 h nach Transfektion eine signifikant erhöhte Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu den Knockdown-Zellen zu sehen ($p = 0,0002$; $p = 0,0027$; Abbildung 12). Ähnlich wie bei den anderen beiden untersuchten Zelllinien, zeigten sich die Effekte erst deutlich nach 72 h, was auf eine verzögerte Reaktion der Zelle auf die veränderten Zustände hindeuten würde.

Es scheint demzufolge ein Zusammenhang zwischen der CDK11 Expression und dem Zellwachstum zu bestehen, wie dies bereits in Brust- und Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie Osteosarkom- und Liposarkom-Zelllinien und zuletzt auch in Melanom-Zellen beschrieben ist [155].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ursache in einer verminderten Proliferation oder einer erhöhten Apoptose-Rate liegt. Daher wird als Nächstes durch Western Blot Analysen der Frage nachgegangen, ob die beobachteten Effekte in einer veränderten Aktivität verschiedener Signalwege begründet sind, welche die Proliferation beeinflussen und für das Überleben verantwortlich sind.

5.3 Aktivität verschiedener Signalwege nach CDK11 Knockdown

Zunächst wurde der PI3-K/AKT-Signalweg betrachtet. Dabei zeigte sich, dass bei den 769-P Zellen nach CDK11 Knockdown die Expression von AKT und seiner Phosphoform deutlich vermindert ist im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Zellen (Abbildung 13). Bei den ACHN- sowie 786-O-Zellen konnte diesbezüglich keine Veränderung gezeigt werden. Unter Umständen ist durch eine verminderte Expression von AKT sowie seiner phosphorylierten Form eine verminderte Aktivität des PI3-K/AKT-Signalweges die Konsequenz, was eine mögliche Ursache des reduzierten Zellwachstums wäre.

Die Arbeiten welche sich mit den Wechselwirkungen von CDK11 und dem AKT-Signalweg beschäftigen sind bisher sehr überschaubar. Aber es wurde eine Herunterregulierung des AKT-Signalweges bei erhöhter Expression von CDK11_{p58} beschrieben mit der Folge einer gesteigerten Apoptose von Neuronen [88]. Dies stünde den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit entgegen, allerdings wurde sich

im Rahmen dieser Arbeit nicht ausschließlich mit der CDK11_{p58} Isoform beschäftigt, sodass hier eine differenziertere Betrachtung nötig wäre.

Weiterhin wurde der MAP-Kinase-Signalweg, speziell die ERK Expression untersucht. Allerdings konnten an dieser Stelle keine Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 16). Auch zeigten sich bei Betrachtung von NF- κ B und dessen Inhibitor I κ B- α keine veränderten Expressionsmuster (Abbildung 17).

Bei den 769-P Zellen liegen also sowohl im Hinblick auf die Zellviabilität, als auch im Fall des AKT-Signalweges deutliche Unterschiede im Vergleich zu ACHN und 786-O vor. Eine Korrelation zwischen der verminderten Zellviabilität und den Veränderungen des AKT-Signalweges nach CDK11 Knockdown ist bei den 769-P Zellen nicht von der Hand zu weisen.

Bedingt durch die AKT-Signalkaskade kann eine Veränderung einerseits die Apoptose-Rate beeinflussen, als auch Auswirkungen auf die Proliferation haben. Um dies zu differenzieren, wurde anschließend zunächst die Rolle der Proliferation in diesem Zusammenhang genauer untersucht.

5.4 CDK11 Expression und Proliferation

Zur Untersuchung, ob eine verminderte Proliferation nach CDK11 Knockdown die beobachteten Effekte erklären kann, wurde der BrdU-Assay an dieser Stelle durchgeführt. Dabei zeigte sich im Fall von ACHN, dass der Anteil der Zellen in der S-Phase bei den Kontroll-Zellen und den si1-Zellen annähernd identisch ist. Lediglich die si2-Zellen zeigen hier einen dazu verringerten Anteil, welcher jedoch statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 18). Nichtsdestotrotz zeigt sich demnach eine tendenziell verminderte Proliferation in den si2RNA-Zellen, welcher sich jedoch insgesamt kaum bemerkbar macht.

Auch bei Betrachtung der Ergebnisse für die 786-O-Zelllinie zeigte sich ein vergleichbares Bild mit ähnlichen Anteilen der jeweiligen Zellen in der S-Phase (Abbildung 19). Im Gegensatz zur ACHN-Zelllinie liegen hier ca. 55 Prozent der Zellen in der G2/M-Phase vor, während dieser Anteil bei ACHN unter 20 Prozent betrug. Ein Großteil der Zellen liegt demzufolge bereits mit doppeltem DNA-Gehalt nach abgeschlossener S-Phase vor, was möglicherweise verhindert, dass diese Zellen das Bromdesoxyuridin einbauen können. Ein Trend beim Vergleich der Zellen, welche sich in der S-Phase befinden, ist nicht klar erkennbar.

Bei den 769-P Zellen ist hingegen der Anteil der sich in der S-Phase befindlichen Knockdown-Zellen geringer als der der Kontroll-Zellen (Abbildung 20). Hier zeigte sich keine Signifikanz, dennoch ist vor allem in den si2-Zellen eine deutliche Reduzierung im Vergleich zu den Kontroll-Zellen zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CDK11 Expression an dieser Stelle nur marginale Effekte auf die Proliferation zu haben scheint. Dies kann mehrere Ursachen haben, die im Folgenden kurz erläutert werden. Einerseits wäre denkbar, dass die einstündige Inkubationszeit mit dem BrdU nicht ausreichend lang gewesen ist, sodass der Anteil der Zellen in der S-Phase insgesamt zu gering ist, um hier deutliche Unterschiede aufzeigen zu können. Möglicherweise bedarf es auch eines zusätzlichen Proliferations-Stimulus unmittelbar vor BrdU-Inkubation, um den zellulären S-Phasen-Anteil zu erhöhen und die Effekte dadurch aufzudecken. Unter Umständen ist auch der Nachbeobachtungs-Zeitraum nicht optimal gewählt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass später einsetzende Effekte nicht detektiert wurden. Inwiefern diese Ergebnisse tatsächlich hinreichend ausschließen, dass der CDK11 Knockdown keine Auswirkungen auf die Proliferation hat, muss jedoch im Kontext weiterer Studien diskutiert werden.

Zhou et. al. wiesen in ihrer Arbeit an Brustkrebs-Zelllinien darauf hin, dass nach CDK11-Knockdown die Proliferation deutlich abnahm [50]. Dies zeigte sich auch in weiteren Arbeiten an Ovarialkarzinom- sowie Ösophaguskarzinom-Zelllinien [81] [76]. An dieser Stelle muss konstatiert werden, dass die verminderte Viabilität nach CDK11 Knockdown in der vorliegenden Arbeit nicht in erster Linie einer verminderten Proliferation geschuldet ist, auch wenn vergleichbare Arbeiten dies nahelegten.

5.5 Sensitivierung verschiedener Therapeutika nach CDK11 Knockdown

Im Folgenden soll die Frage geklärt werden, inwiefern das Fehlen von CDK11 die Sensitivität der untersuchten Zelllinien gegenüber einigen konventionellen Therapeutika (Sunitinib, Everolimus) und dem experimentellen Therapieansatz mit ABT-737 verändert.

Es zeigte sich, dass die Behandlung der ACHN Zellen mit ABT-737 mit steigender Konzentration zu einer deutlichen Reduktion der si1-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen führt. Bei einer Konzentration von 5,56 μM wird dieser Unterschied signifikant (Abbildung 21). Werden die beiden gängigen Therapeutika Sunitinib sowie

Everolimus betrachtet, zeigt sich bei den ACHN-Zellen die exakt gegenläufige Entwicklung. Es wird bereits ab einer jeweiligen Konzentration von 0,5 μM eine signifikante Resistenzsteigerung der Knockdown-Zellen in Bezug zu den Kontroll-Zellen erkennbar (Abbildungen 22 und 23). Die CDK11 Expression hat also in Bezug auf die untersuchten Therapeutika ambivalente Folgen: Einerseits wird die Sensitivität gegenüber ABT-737 gesteigert, gleichzeitig ist eine erhöhte Resistenz gegenüber den etablierten Medikamenten zu beobachten.

Die Ergebnisse der 786-O Zellen zeigen bezüglich der Sunitinib- sowie Everolimus-Therapie eine ähnliche Tendenz wie im Fall der ACHN-Zellen (Abbildungen 25 und 26). Die gesteigerte Resistenz wird hier allerdings erst bei den höheren Konzentrationen (Sunitinib: 5 μM ; Everolimus: 1 μM) signifikant. Das therapeutische Ansprechen auf ABT-737 zeigt hier keine klare Tendenz (Abbildung 24). Da in der 786-O Zelllinie Bcl-2 praktisch nicht exprimiert wird, ist es auch nicht weiter verwunderlich dass der ABT-737 als Bcl-2/Bcl-xL-Inhibitor kaum Wirkung entfaltet (Abbildung 33).

Bei den 769-P wiederholt sich die schon bei den ACHN-Zellen gemachte Beobachtung einer gesteigerten Sensitivität gegenüber ABT-737 (Abbildung 27). Bereits bei einer Konzentration von 2,78 μM zeigt sich gegenüber beiden Knockdown Zellen eine signifikante Veränderung. Wie bei den beiden anderen Zelllinien liegt auch an dieser Stelle einer gesteigerte Resistenz gegenüber Sunitinib und Everolimus vor (Abbildungen 28 und 29). Diese ist im Fall von Sunitinib signifikant, bei Everolimus nur in der Tendenz.

Dass der CDK11 Knockdown auch in anderen Zelllinien die Effektivität einer zytotoxischen Therapie steigern kann, wurde an Liposarkom-Zellen gezeigt. Hier zeigte sich eine stark verminderte Viabilität bei den Knockdown Zellen nach Doxorubicin-Therapie im Vergleich zu den Kontrollen [79]. Die gilt auch für Ovarialkarzinom-Zelllinien, die nach Knockdown einer Paclitaxel-Therapie unterzogen wurden [81].

Es bleibt festzuhalten, dass der CDK11 Knockdown in allen 3 Zelllinien zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber den Standard-Therapeutika Sunitinib sowie Everolimus führt. Die erhöhte Sensitivität von ACHN und 769-P gegenüber ABT-737 ist jedoch ein interessanter Aspekt, welcher nachfolgend näher untersucht wird.

5.6 CDK11 Knockdown und Apoptose

5.6.1 Annexin-V

Nachdem eine reduzierte Viabilität der ACHN- und 769-P Zellen nach der Behandlung mit ABT-737 beobachtet wurde, soll nun geklärt werden, ob eine erhöhte Apoptose-Rate hierfür ursächlich ist. Dies wurde durchflusszytometrisch nach Annexin-V- und 7-AAD-Färbung gemessen. Als Kontrolle fungierte eine unbehandelte Färbung.

Die Apoptose-Rate zeigte bei der unbehandelten ACHN-Zellen tendenziell höhere Werte bei den Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abbildung 30). Nach Behandlung mit ABT-737 sind diese Beobachtungen nicht mehr feststellbar und die Raten der apoptotischen Zellen nähern sich an.

Die Apoptose-Rate der unbehandelten 786-O-Zellen lässt ebenfalls eine geringe Tendenz zu höheren Werten bei den Knockdown-Zelle verglichen mit den Kontroll-Zellen erkennen (Abbildung 31). Nach Behandlung mit ABT-737 verstärken sich diese Effekte mit zunehmender Konzentration vor allem bei den si1-Zellen.

Auch bei den unbehandelten 769-P-Zellen lässt sich eine Tendenz hin zu einer etwas erhöhten Apoptose-Rate der Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachten (Abbildung 32). Bei einer ABT-737-Konzentration von 10 μM liegt der Unterschied der Apoptose-Rate der Kontrolle gegenüber den si1-Zellen signifikant vermindert vor ($p = 0,0407$).

In der Gesamtschau wird erkennbar, dass die Apoptose-Rate der unbehandelten Knockdown-Zellen lediglich eine Tendenz hin zu gesteigerten Werten gegenüber den Kontroll-Zellen aufzeigt. Statistische Signifikanz wurde in keinem Fall erreicht, auch wenn vor allem bei der ACHN Zelllinie erkennbare Unterschiede aufgezeigt wurden. Daher scheint der Knockdown von CDK11 nicht zu einer relevant erhöhten Apoptose-Rate zu führen.

Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse der bereits oben erwähnten Arbeit von Zhou. Die untersuchten Brustkrebs-Zelllinien zeigten einen deutlich erhöhten Anteil an Zellen in der G1-Phase nach Knockdown. Ein Arrest am Übergang von der G1- zur S-Phase liegt dem nach Ansicht der Autoren zugrunde [50]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Zelllinien des Malignen Melanoms gemacht, in denen ebenfalls ein Zellzyklusarrest durch Akkumulation von Zellen in der G1-Phase beobachtet wurde [155]. Eine erhöhte Apoptose-Rate nach CDK11 Knockdown zeigte sich auch bei einer durchflusszytometrischen Untersuchung an

Ösophaguskarzinom-Zellen [76]. Hier lagen allerdings im Vergleich zu den Kontrollen vermehrt Knockdown-Zellen in der G2/M-Phase vor. Dies wäre im Einklang mit der Funktion von CDK11_{p58}, welche ausschließlich in dieser Phase des Zellzyklus exprimiert ist und in den Übergang von der G2- zur M-Phase involviert ist.

Nach Behandlung mit ABT-737 zeigte sich zwar eine erhöhte Apoptose-Rate nach CDK11 Knockdown, allerdings war dies nur im Fall von 769-P und einer hohen Konzentration von 10 µM signifikant.

Eine gänzlich andere Erklärung würde sich ergeben, wenn eine gesteigerte Autophagie als Ursache in Betracht gezogen würde. Denn CDK11 wirkt modulierend auf die Prozesse der Autophagie, was ebenfalls zu einem verringerten Zellwachstum führen könnte [153]. Da in diesem Fall jedoch die Proteine p62 und LC3 involviert wären, deren Expression in unseren Versuchen unverändert vorliegt, scheint dies eher unwahrscheinlich zu sein.

5.6.2 Apoptose-regulierende Proteine

Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Expression von Proteinen nach CDK11 Knockdown variiert ist, die entweder pro- oder anti-apoptotische Wirkung entfalten. Es lässt sich sagen, dass nur wenige der insgesamt betrachteten Proteine eine veränderte Expression aufwiesen. Lediglich das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 sowie das pro-apoptotisch wirkende Bim wiesen bei der Zelllinien ACHN und 769-P eine verminderte Expression auf (Abbildung 33 und 34). Es zeigten sich also an dieser Stelle widersprüchliche Ergebnisse auf, was natürlich durch die Selektion der untersuchten Proteine bedingt sein kann und nur einen Anhaltspunkt zur Beantwortung der Frage liefern kann, inwiefern Apoptose-regulierende Proteine in die Zellviabilität nach CDK11 Knockdown involviert sind.

Eine reduzierte Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie z.B. Mcl-1 und Bcl-xL wurde hingegen auch bei Untersuchung weiterer Zelllinien nach Knockdown von CDK11_{p110} beobachtet [75] [50] [80] [155]. Es resultiert nach Knockdown in diesen Fällen eine erhöhte Apoptose-Rate.

Die Rolle von Bcl-2 wurde im Rahmen einer Arbeit über das hepatozelluläre Karzinom näher untersucht. Danach ist CDK11_{p58} in der Lage, das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 herunter zu regulieren [156]. Diese Konstellation wirkt demzufolge pro-apoptotisch auf die Tumorzellen. Es zeigen sich also z.T. widersprüchliche Auswirkungen der verschiedenen CDK11-Isoformen auf die Tumorzellen.

5.7 CDK11 Expression und E2F1

Es wurde im Rahmen der Untersuchungen eine weitere interessante Beobachtung gemacht, als die verminderte Expression des Transkriptionsfaktors E2F1 bei den ACHN- und 769-P-Knockdown-Zellen auffiel (Abbildung 38). Bei der 786-O-Zelllinie war dieser Effekt nur in den si1-Zellen erkennbar.

Um die Auswirkungen genauer nachvollziehen zu können, wurde im Folgenden vergleichbar dem Vorgehen im Fall von CDK11, ein Knockdown von E2F1 mittels einer siRNA durchgeführt (Abbildung 39). Dabei ergab sich, dass die E2F1 Expression im Fall der 769-P Zelllinie am stärksten ausgeprägt war. Es folgten in absteigender Reihenfolge ACHN und 786-O. Die Effektivität des Knockdowns gelang in allen Zelllinien vergleichbar gut.

Zunächst stand dabei die Frage nach einer veränderten Viabilität der E2F1-Knockdown-Zellen im Mittelpunkt.

5.8 Viabilität und E2F1 Expression

Das Zellwachstum bei der ACHN-Linie zeigt bei den Knockdown-Zellen nach 72 h eine tendenziell geringere Zellzahl im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abbildung 40). Diese Differenz zeigt jedoch keine statistische Signifikanz.

Bei den 786-O-Zellen ist lediglich eine minimale Abweichung der untersuchten Zellzahlen voneinander abgrenzbar (Abbildung 41).

Hingegen ist bei den 769-P Zellen nach 72 h eine signifikante Verminderung der Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar ($p = 0,001$; Abbildung 42).

Angesichts der E2F1-Expression, welche bei den 769-P Zellen am höchsten ist, scheint das Fehlen dieses Proteins sich auch am stärksten auf die Zellviabilität auszuwirken. Als Transkriptionsfaktor, welcher den Übertritt in die S-Phase des Zellzyklus überwacht, ist die verminderte Zellzahl möglicherweise auf einen Zyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase ursächlich.

5.9 E2F1 Expression und AKT-Signalweg

Um zu klären, ob eine veränderte Aktivität des AKT-Signalweges Einfluss auf die Viabilität nach E2F1-Knockdown hat, wurde auf Proteinebene zunächst die AKT-Expression untersucht. Dabei zeigten sich jedoch im Gegensatz zur phosphorylierten

Form von AKT keine veränderten Expressionsmuster (beides Abbildung 43). Letztere zeigte bei den ACHN- sowie 769-P- Knockdown-Zellen eine verminderte Expression, wobei die Expression bei den Kontroll-Zellen selbst nicht sehr ausgeprägt war.

Auch bei Betrachtung der phosphorylierten p70-S6 Kinase zeigte sich bei den 769-P Knockdown-Zellen eine verminderte Expression, ebenso wie bei der S6 Kinase und deren phosphorylierter Form (Abbildungen 44 und 45).

Der Zusammenhang zwischen der Expression von E2F1 und dem AKT-Signalweg wurde deutlich in einer Arbeit an Melanomzellen [157]. E2F1 ist demnach in der Lage, die Phosphorylierung von AKT zu induzieren mit der Folge einer fortbestehenden Aktivierung des AKT-Signalweges. Diese Beobachtung wurde jüngst auch bei Nierenzellkarzinom Zellen bestätigt [158]. Demnach bedingt eine verminderte Expression von E2F1 eine Reduzierung der pAKT-Spiegel. Die Folge ist ein vermindertes Zellwachstum.

5.10 Sensitivierung verschiedener Therapeutika nach E2F1 Knockdown

Ebenso wie nach CDK11 Knockdown, so wurde eine Sensitivierung gegenüber den bereits unter 5.5 verwendeten Therapeutika nach E2F1 Knockdown untersucht. Es zeigte sich, dass die ACHN Zellen gegenüber einer Behandlung mit ABT-737 nur marginale Unterschiede aufweisen (Abbildung 46). Eine Resistenzsteigerung bei einer Konzentration von 5 μM zeigten die ACHN-Knockdown Zellen gegenüber Sunitinib, wobei im Fall einer geringeren Konzentration der gegenteilige Effekt zu beobachten ist ($p < 0,01$; Abbildung 47). Gegenüber Everolimus zeigt sich bei 0,5 μM ebenfalls eine Resistenzsteigerung ($p < 0,05$; Abbildung 48).

Auch bei den 786-O Zellen zeigt die Behandlung mit ABT-737 kaum Unterschiede (Abbildung 49). Unter Sunitinib-Behandlung zeigte sich eine gesteigerte Sensitivität bei den Knockdown-Zellen, welche bei einer Konzentration von 0,5 μM signifikant ist (Abbildung 50). Diese nimmt jedoch mit steigender Konzentration wieder ab. Gegenüber einer Everolimus-Therapie zeigen sich zu vernachlässigende Unterschiede (Abbildung 51).

Eine signifikante und mit steigender Konzentration größer werdende Sensitivität zeigt sich bei einer ABT-737-Behandlung gegenüber den 769-P Knockdown-Zellen (Abbildung 52). Eine zunehmende Sensitivität, die bei hoher Konzentration signifikant

wird, zeigt sich auch bei der Behandlung mit Sunitinib (Abbildung 53). Everolimus bewirkt nur minimale Effekte (Abbildung 54).

Zusammenfassend zeigt sich bei den ACHN Zellen nach Knockdown tendenziell eine gesteigerte Resistenz bei allen untersuchten Substanzen. Demgegenüber zeigt sich bei den 786-O Zellen die gegenteilige Entwicklung mit einer, meist nur in der Tendenz, gesteigerten Sensitivität gegenüber den drei Therapeutika. Wenn die 769-P Knockdown-Zellen betrachtet werden, so zeigt sich eine signifikant reduzierte Viabilität nach ABT-737- sowie einer Sunitinib-Behandlung.

5.11 E2F1 Knockdown und Apoptose

Abschließend wurde untersucht, ob das Fehlen von E2F1 mit einer erhöhten Apoptose-Rate in Verbindung gebracht werden kann. Dazu wurde im Western blot die Expression des pro-apoptotisch wirkenden Proteins Bim untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhöhte Bim-Expression der 786-O und 769-P Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen erkennbar war (Abbildung 55). Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich in den 786-O Zellen.

Diese Beobachtung könnte besonders mit Blick auf die 769-P Zellen darauf hindeuten, dass die reduzierte Viabilität nach E2F1-Knockdown konsekutiv eine erhöhte Apoptose in Form einer gesteigerten Expression von Bim induziert. Dies ist als ein Faktor der reduzierten Zellzahl sicherlich in Erwägung zu ziehen.

Davon ausgehend, scheint aufgrund der geringeren E2F1 Expression bei den 786-O Knockdown Zellen die Zunahme von Bim nicht erklärbar. Für sich genommen kann also Bim unter Umständen nicht so weitreichende Effekte erzielen wie im Fall der 769-P Zellen.

5.12 Zusammenhang zwischen CDK11 und E2F1 – eine Hypothese

Abschließend soll nun versucht werden, alle Beobachtungen zu einer Hypothese zusammen zu fügen. Dabei sollen zunächst die Auswirkungen des CDK11 Knockdowns auf die Frage der Viabilität betrachtet werden, anschließend soll die veränderte Sensitivität angesprochen werden. Die CDK11 Expression scheint in allen untersuchten Zelllinien ähnlich stark zu sein.

Die deutlichsten Effekte nach CDK11 Knockdown zeigten sich in der 769-P Zelllinie, da diese eine signifikant verminderte Viabilität nach 72 h aufwies. Betrachtet man

in der Folge die verminderte Expression des Transkriptionsfaktors E2F1, so lässt sich in Übereinstimmung mit jüngsten Arbeiten folgender Zusammenhang postulieren: Eine reduzierte Expression von E2F1 führt über eine verminderte Aktivierung des AKT Signalweges zu einer tendenziell reduzierten Proliferation und erhöhten Apoptose [158]. Denn sowohl nach CDK11 Knockdown, als auch nach E2F1 Knockdown liegen reduzierte Spiegel von pAKT vor. Wirft man einen Blick auf die Abbildungen 38 und 39 so ergibt sich folgender Sachverhalt. Nach E2F1 Knockdown liegt eine nahezu vollständige Reduktion der E2F1 Spiegel vor, während nach CDK11 Knockdown zwar eine deutliche, wenn auch im Vergleich nicht vollständige Verringerung der E2F1 Spiegel erkennbar wird. Es ist also möglich, dass eine stärkere Reduktion der E2F1 Spiegel in der Folge auch dessen fehlende Wirkungen in verstärktem Maße beeinflussen. So ist es denkbar, dass mit pp70 S6K, S6 und pS6 die Expression weiterer Proteine des AKT Signalweges nach E2F1 Knockdown vermindert sind, was unter Umständen die reduzierte Aktivität des Signalweges bestätigt. Da es zwar eine reduzierte, wenn auch nicht gänzlich, verminderte Expression von E2F1 nach CDK11 Knockdown gab, wurde diese „Schwelle“ möglicherweise nicht erreicht. Hinzu kommt die Tatsache, dass mit Bcl-2 ein anti-apoptotisch wirkendes Protein nach CDK11 Knockdown in deutlich reduzierter Expression vorlag und eventuell auf diesem Wege vermehrt Zellen in die Apoptose getrieben wurden.

Diese Erklärungen finden ihre Bestätigung ebenso in der ACHN Zelllinie, denn die E2F1 Expression war auch hier nach CDK11 Knockdown vermindert. Allerdings zeigte sich nach CDK11 Knockdown keine so deutliche Verringerung im Vergleich zwischen der Kontrolle und den Knockdown-Zellen. Daher sind die Effekte als nicht so weitreichend einzustufen. Sie reichen aber immerhin aus, tendenziell zu einem verringerten Zellwachstum zu führen. Auch hier wurde demzufolge durch den reduzierten E2F1 Spiegel eine verminderte Expression von pAKT erzielt. Und auch Bcl-2 zeigte nach CDK11 Knockdown eine verringerte Expression. Allerdings waren die Unterschiede auch an dieser Stelle im Vergleich zu den Kontrollen nicht so stark. Zusammengenommen ergeben sich also die Folgen des CDK11 Knockdowns, indem zelluläre Funktionen wie der AKT Signalweg durch eine reduzierte Expression von E2F1 beeinflusst werden.

Während der CDK11- sowie der E2F1 Knockdown in Bezug auf die Zellviabilität funktionell gleichgerichtet zu sein scheint, sieht dies bei den Folgen für die untersuchten Therapeutika nicht mehr so eindeutig aus. Denn nach CDK11

Knockdown zeigte sich bei den ACHN Knockdown Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit ABT-737. Nachdem E2F1 herunterreguliert wurde, lag im Gegensatz dazu eine in der Tendenz verminderte Sensitivität vor. Möglicherweise liegt dies an einer veränderten Expression von Bcl-2 und/oder Bcl-xL, deren Inhibitor ABT-737 darstellt. Da 786-O keine Bcl-2 Expression aufwies und auch kein Ansprechen gegenüber ABT-737, liegt die Vermutung nahe dass die Wirkung primär Bcl-2-vermittelt abläuft. Denn die Expression von Bcl-xL unterliegt kaum Schwankungen zwischen Kontroll- und Knockdown Zellen. Bestätigen würde dies auch der Fakt, dass 769-P in den Kontrollen die höchste Expression von Bcl-2 aufweist und die gesteigerte Sensitivität sowohl nach CDK11- als auch nach E2F1 Knockdown nachweisbar war. Diese war nach CDK11 Knockdown sogar hochsignifikant, während dies im Fall der ACHN Zellen nur bei den si1-Zellen zu sehen war. Die Ursache der unterschiedlichen Ansprechrate von ABT-737 liegt also möglicherweise in verschiedenen Expressionslevel von Bcl-2 nach Knockdown von CDK11 bzw. E2F1 begründet.

Hingegen zeigte sich bei den beiden Zelllinien 786-O und 769-P in Bezug auf eine Behandlung mit Sunitinib jeweils die entgegengesetzte Entwicklung. Hier lag in beiden Fällen eine reduzierte Sensitivität nach CDK11 Knockdown vor, die sich nach E2F1 Knockdown in eine gesteigerte Sensitivität umgewandelt hat. Die Sunitinib Behandlung nach CDK11 Knockdown zeigte bei den 786-O Zellen mit zunehmender Konzentration eine gesteigerte Resistenzentwicklung. Nach E2F1 Knockdown zeigte sich in der Tendenz bei allen Sunitinib Konzentrationen eine gesteigerte Sensitivität bei den Knockdown Zellen, diese war jedoch nur bei der geringsten Konzentration signifikant. Eine verringerte Sensitivität gegenüber Sunitinib nach CDK11 Knockdown gepaart mit einer gesteigerten Sensitivität nach E2F1 Knockdown zeigte sich auch bei den 769-P Zellen.

Diese Unterschiede sind aus den vorliegenden Daten, welche im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, nicht ohne weiteres erklärbar. Sofern man davon ausgeht, dass die Expressionslevel von E2F1 nach CDK11 Knockdown nicht so gering sind wie nach E2F1 Knockdown, könnte man folgender Überlegung nachgehen: Bei relativ gesehen erhöhter Expression von E2F1 nach CDK11 Knockdown, liegt dadurch bedingt eine gesteigerte Chemoresistenz vor [99]. Wenn nach E2F1 Knockdown der Expressionsspiegel weiter sinkt, wie im Fall von 769-P, dann sinkt auch die Resistenz gegenüber Sunitinib mit der Folge einer erhöhten Sensitivität. Dass eine gesteigerte Sensitivität auch bei der 786-O Zelllinie beobachtet wird, die

E2F1 nur gering exprimiert, steht dieser Vorstellung jedoch etwas im Wege. Eine vage Vermutung könnte zudem angestellt werden bei Betrachtung der untersuchten Zelllinien. Denn die ACHN Zelllinie weist im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien keine VHL Mutationen auf [159]. Diese Mutationen könnten durch den E2F1 Knockdown unter Umständen die Vulnerabilität gegenüber Sunitinib erhöhen.

6. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom stellt aufgrund seiner hohen Rezidivrate und dem häufigen Auftreten von Fernmetastasen trotz der erzielten Fortschritte der letzten Jahre eine therapeutische Herausforderung dar. Auch wenn durch die Einführung neuer zielgerichteter Medikamente die Prognose entscheidend verbessert werden konnte, blieben dennoch die Ansprechraten dieser Therapeutika hinter den Erwartungen zurück. Daher stellt die Suche nach diesbezüglichen prognostischen Faktoren, sowie neuen Therapieansätzen einen Fokus in der experimentellen Forschung dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Nierenzellkarzinommodell untersucht, welche Auswirkungen der Knockdown der Cyclin-abhängigen Kinase 11 und von E2F1 in ihrer Funktion als Zellzyklusregulatoren hat.

Es zeigte sich, dass im Fall des Fehlens von CDK11 in einigen Fällen ein geringeres Zellwachstum beobachtet werden konnte. Ursächlich könnte in diesem Zusammenhang eine reduzierte Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges sein. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors E2F1, welche infolge des Knockdowns von CDK11 induziert wird. Dieser Effekt könnte durch die ebenfalls verminderte Expression des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 noch gesteigert werden.

Weiterhin konnte vereinzelt eine gesteigerte Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit dem experimentellen Bcl-2-Inhibitor ABT-737 gezeigt werden. Andererseits wurde jedoch eine erhöhte Resistenz bei der Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib sowie dem mTOR-Inhibitor Everolimus als Vertreter klassischer Therapeutika nachgewiesen. Diese Tendenz wurde nach E2F1 Knockdown im Fall von Sunitinib zum Teil aufgehoben, da sich in der Folge eine erhöhte Ansprechraten zeigte. Hintergrund könnte unter Umständen der Charakter von E2F1 als Modulator einer Chemoresistenz in Abhängigkeit vom Expressionslevel sein.

In Zusammenschau lässt sich festhalten, dass der Knockdown von CDK11 und konsekutiv von E2F1 ein reduziertes Zellwachstum durch Kombination einer tendenziell verminderten Proliferation und einer erhöhten Apoptose-Sensitivität zu bewirken scheint. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten der Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen der zugrundeliegenden Prozesse sein, welche potentiell eine Aussage zur Ansprechraten der zielgerichteten Therapeutika erlauben könnten.

7. Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017, 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin. p. 100-102.
2. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 115-24.
3. Yang, J.C., et al., *A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(5): p. 427-34.
4. Hudes, G., et al., *Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(22): p. 2271-81.
5. Dos Santos Papparis, N.F. and F. Canduri, *The Emerging Picture of CDK11: Genetic, Functional and Medicinal Aspects*. Curr Med Chem, 2018. **25**(8): p. 880-888.
6. Turner, N.C., et al., *Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(3): p. 209-19.
7. Poppy Roworth, A., F. Ghari, and N.B. La Thangue, *To live or let die - complexity within the E2F1 pathway*. Mol Cell Oncol, 2015. **2**(1): p. e970480.
8. *Klinisches Wörterbuch Pschyrembel*. Vol. 261. Auflage. 2007, Berlin: Walter de Gruyter. 1347.
9. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Kurzversion*. 2017, Version 1.1: Berlin.
10. Cohen, H.T. and F.J. McGovern, *Renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2477-90.
11. Moch, H., et al., *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*. Eur Urol, 2016. **70**(1): p. 93-105.
12. A. Roessner, U.P., H. K. Müller-Hermelink, *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. Vol. 11. Auflage. 2008, München: Elsevier, Urban&Fischer 544.
13. Brugarolas, J., *Renal-cell carcinoma--molecular pathways and therapies*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 185-7.
14. Banks, R.E., et al., *Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2000-11.
15. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 43-9.
16. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin, *Role of VHL gene mutation in human cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(24): p. 4991-5004.
17. Kaelin, W.G., Jr., *The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 2): p. 6290S-5S.
18. Gordan, J.D., et al., *HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma*. Cancer Cell, 2008. **14**(6): p. 435-46.
19. Fingar, D.C., et al., *mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 200-16.

20. Hudson, C.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 7004-14.
21. Cho, D., et al., *Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma*. Clin Genitourin Cancer, 2007. **5**(6): p. 379-85.
22. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-892.
23. Motzer, R.J., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2018. **378**(14): p. 1277-1290.
24. Bamias, A., et al., *Current Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Critical Evaluation*. Oncologist, 2017. **22**(6): p. 667-679.
25. Motzer, R.J., et al., *Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial*. Lancet, 2008. **372**(9637): p. 449-56.
26. Escudier, B., et al., *Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 125-34.
27. Sternberg, C.N., et al., *Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial*. J Clin Oncol, 2010. **28**(6): p. 1061-8.
28. Motzer, R.J., et al., *Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(8): p. 722-31.
29. Choueiri, T.K., et al., *Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update*. Eur J Cancer, 2018. **94**: p. 115-125.
30. Motzer, R.J., et al., *Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(15): p. 1473-1482.
31. Choueiri, T.K., et al., *Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(7): p. 917-927.
32. Harding, M.W., *Immunophilins, mTOR, and pharmacodynamic strategies for a targeted cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2882-6.
33. Motzer, R.J., et al., *Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(19): p. 1803-13.
34. Motzer, R.J., et al., *Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2019. **380**(12): p. 1103-1115.
35. Rini, B.I., et al., *Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2019. **380**(12): p. 1116-1127.
36. Woo, S.M., et al., *YM155 enhances ABT-737-mediated apoptosis through Mcl-1 downregulation in Mcl-1-overexpressed cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2017. **429**(1-2): p. 91-102.
37. Yin, P., et al., *ABT-737, a Bcl-2 Selective Inhibitor, and Chloroquine Synergistically Kill Renal Cancer Cells*. Oncol Res, 2016. **24**(1): p. 65-72.
38. Woo, S.M., et al., *Cafestol overcomes ABT-737 resistance in Mcl-1-overexpressed renal carcinoma Caki cells through downregulation of Mcl-1 expression and upregulation of Bim expression*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1514.

39. Zhu, S., et al., *PI3K inhibition potentiates Bcl-2-dependent apoptosis in renal carcinoma cells*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(3): p. 377-85.
40. Ackler, S., et al., *ABT-263 and rapamycin act cooperatively to kill lymphoma cells in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(10): p. 3265-74.
41. Rudin, C.M., et al., *Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(11): p. 3163-9.
42. Evans, T., et al., *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, 1983. **33**(2): p. 389-96.
43. Beach, D., B. Durkacz, and P. Nurse, *Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast*. Nature, 1982. **300**(5894): p. 706-9.
44. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
45. Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases*. Genome Biol, 2014. **15**(6): p. 122.
46. Malumbres, M., et al., *Cyclin-dependent kinases: a family portrait*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1275-6.
47. Eipers, P.G., et al., *Localization of the expressed human p58 protein kinase chromosomal gene to chromosome 1p36 and a highly related sequence to chromosome 15*. Genomics, 1991. **11**(3): p. 621-9.
48. Bunnell, B.A., et al., *Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7467-71.
49. Drogat, J., et al., *Cdk11-cyclinL controls the assembly of the RNA polymerase II mediator complex*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1068-76.
50. Zhou, Y., et al., *Cyclin-dependent kinase 11(p110) (CDK11(p110)) is crucial for human breast cancer cell proliferation and growth*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10433.
51. Xiang, J., et al., *Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms*. J Biol Chem, 1994. **269**(22): p. 15786-94.
52. Loyer, P., et al., *Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing*. Cell Signal, 2005. **17**(9): p. 1033-51.
53. Li, T., et al., *Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11(p110/p58)-null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3188-97.
54. Zhou, Y., et al., *The emerging roles and therapeutic potential of cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in human cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(26): p. 40846-40859.
55. Loyer, P., et al., *Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7721-32.
56. Trembley, J.H., et al., *PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2589-96.
57. Loyer, P., et al., *The RNP protein, RNPS1, associates with specific isoforms of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase in vivo*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 11)**: p. 1495-506.
58. Hu, D., et al., *CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8623-9.
59. Pak, V., et al., *CDK11 in TREX/THOC Regulates HIV mRNA 3' End Processing*. Cell Host Microbe, 2015. **18**(5): p. 560-70.
60. Cornelis, S., et al., *Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site*. Mol Cell, 2000. **5**(4): p. 597-605.

61. Petretti, C., et al., *The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation*. EMBO Rep, 2006. **7**(4): p. 418-24.
62. Yokoyama, H., et al., *Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate*. J Cell Biol, 2008. **180**(5): p. 867-75.
63. Hu, D., et al., *CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 14): p. 2424-34.
64. Kong, X., et al., *CDK11p58 phosphorylation of PAK1 Ser174 promotes DLC2 binding and roles on cell cycle progression*. J Biochem, 2009. **146**(3): p. 417-27.
65. Chi, Y., et al., *Thr-370 is responsible for CDK11(p58) autophosphorylation, dimerization, and kinase activity*. J Biol Chem, 2011. **286**(3): p. 1748-57.
66. Zhang, S., et al., *Interaction of p58(PITSLRE), a G2/M-specific protein kinase, with cyclin D3*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35314-22.
67. Mikolajczyk, M. and M.A. Nelson, *Regulation of stability of cyclin-dependent kinase CDK11p110 and a caspase-processed form, CDK11p46, by Hsp90*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 3): p. 461-7.
68. Lahti, J.M., et al., *PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 1-11.
69. Mikolajczyk, M., et al., *The cyclin-dependent kinase 11(p46) isoform interacts with RanBPM*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(1): p. 14-8.
70. Shi, J. and M.A. Nelson, *The cyclin-dependent kinase 11 interacts with NOT2*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1310-6.
71. Shi, J., et al., *The p34cdc2-related cyclin-dependent kinase 11 interacts with the p47 subunit of eukaryotic initiation factor 3 during apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5062-71.
72. Feng, Y., et al., *Death-signal-induced relocalization of cyclin-dependent kinase 11 to mitochondria*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 1): p. 65-73.
73. Lahti, J.M., et al., *Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex on chromosome 1p36 in childhood neuroblastoma*. Nat Genet, 1994. **7**(3): p. 370-5.
74. Ariza, M.E., et al., *Fas-induced apoptosis in human malignant melanoma cell lines is associated with the activation of the p34(cdc2)-related PITSLRE protein kinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28505-13.
75. Duan, Z., et al., *Systematic kinome shRNA screening identifies CDK11 (PITSLRE) kinase expression is critical for osteosarcoma cell growth and proliferation*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4580-8.
76. Du, Y., et al., *CDK11(p110) plays a critical role in the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma cells and is a potential drug target*. Cell Cycle, 2019. **18**(4): p. 452-466.
77. Feng, Y., et al., *Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system*. J Orthop Res, 2015. **33**(2): p. 199-207.
78. Liao, Y., et al., *Androgen receptor is a potential novel prognostic marker and oncogenic target in osteosarcoma with dependence on CDK11*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43941.
79. Jia, B., et al., *Cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) is crucial in the growth of liposarcoma cells*. Cancer Lett, 2014. **342**(1): p. 104-12.
80. Kren, B.T., et al., *Preclinical evaluation of cyclin dependent kinase 11 and casein kinase 2 survival kinases as RNA interference targets for triple negative breast cancer therapy*. Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 19.

81. Liu, X., et al., *Cyclin-Dependent Kinase 11 (CDK11) Is Required for Ovarian Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo, and Its Inhibition Causes Apoptosis and Sensitizes Cells to Paclitaxel*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(7): p. 1691-701.
82. Tiedemann, R.E., et al., *Kinome-wide RNAi studies in human multiple myeloma identify vulnerable kinase targets, including a lymphoid-restricted kinase, GRK6*. *Blood*, 2010. **115**(8): p. 1594-604.
83. Tiedemann, R.E., et al., *Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNA interference lethality screening of the druggable genome*. *Cancer Res*, 2012. **72**(3): p. 757-68.
84. Chi, Y., et al., *CDK11p58 inhibits ERalpha-positive breast cancer invasion by targeting integrin beta3 via the repression of ERalpha signaling*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 577.
85. Chi, Y., et al., *Critical role of CDK11(p58) in human breast cancer growth and angiogenesis*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 701.
86. Chi, Y., et al., *Abnormal expression of CDK11p58 in prostate cancer*. *Cancer Cell Int*, 2014. **14**(1): p. 2.
87. Duan, Y., et al., *Cyclin D3/CDK11(p58) complex involved in Schwann cells proliferation repression caused by lipopolysaccharide*. *Inflammation*, 2010. **33**(3): p. 189-99.
88. Liu, X., et al., *LPS-stimulating astrocyte-conditioned medium causes neuronal apoptosis via increasing CDK11(p58) expression in PC12 cells through downregulating AKT pathway*. *Cell Mol Neurobiol*, 2013. **33**(6): p. 779-87.
89. Ji, Y., et al., *Increased expression of CDK11p58 and cyclin D3 following spinal cord injury in rats*. *Mol Cell Biochem*, 2008. **309**(1-2): p. 49-60.
90. Bajic, V.P., et al., *Mislocalization of CDK11/PITSLRE, a regulator of the G2/M phase of the cell cycle, in Alzheimer disease*. *Cell Mol Biol Lett*, 2011. **16**(3): p. 359-72.
91. Rice, A.P., *Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets for HIV-1 infection*. *Expert Opin Ther Targets*, 2016. **20**(12): p. 1453-1461.
92. Kovcsdi, I., R. Reichel, and J.R. Nevins, *Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation*. *Cell*, 1986. **45**(2): p. 219-28.
93. La Thangue, N.B. and P.W. Rigby, *An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells*. *Cell*, 1987. **49**(4): p. 507-13.
94. Attwooll, C., E. Lazzerini Denchi, and K. Helin, *The E2F family: specific functions and overlapping interests*. *EMBO J*, 2004. **23**(24): p. 4709-16.
95. Tsantoulis, P.K. and V.G. Gorgoulis, *Involvement of E2F transcription factor family in cancer*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(16): p. 2403-14.
96. Lukas, J., et al., *Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(3): p. 1047-57.
97. Trimarchi, J.M. and J.A. Lees, *Sibling rivalry in the E2F family*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(1): p. 11-20.
98. Xanthoulis, A. and D.G. Tiniakos, *E2F transcription factors and digestive system malignancies: how much do we know?* *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(21): p. 3189-98.
99. Putzer, B.M. and D. Engelmann, *E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back*. *Trends Mol Med*, 2013. **19**(2): p. 89-98.
100. Nevins, J.R., et al., *Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control*. *J Cell Physiol*, 1997. **173**(2): p. 233-6.

101. Bandara, L.R. and N.B. La Thangue, *Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor*. *Nature*, 1991. **351**(6326): p. 494-7.
102. Chellappan, S.P., et al., *The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein*. *Cell*, 1991. **65**(6): p. 1053-61.
103. DeGregori, J., et al., *Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(14): p. 7245-50.
104. Chen, H.Z., S.Y. Tsai, and G. Leone, *Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(11): p. 785-97.
105. La Thangue, N.B., *DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(3): p. 443-50.
106. Helin, K., et al., *Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation*. *Genes Dev*, 1993. **7**(10): p. 1850-61.
107. Frolov, M.V. and N.J. Dyson, *Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 11): p. 2173-81.
108. Wu, L., et al., *The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation*. *Nature*, 2001. **414**(6862): p. 457-62.
109. Polager, S., et al., *E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis*. *Oncogene*, 2002. **21**(3): p. 437-46.
110. Phillips, A.C., et al., *E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways*. *Mol Cell*, 1999. **4**(5): p. 771-81.
111. Morales, L.D., et al., *SHP-2 and PTP-pest induction during Rb-E2F associated apoptosis*. *Cell Mol Biol Lett*, 2012. **17**(3): p. 422-32.
112. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(9): p. 621-32.
113. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 703-16.
114. Ingram, L., et al., *E2F-1 regulation by an unusual DNA damage-responsive DP partner subunit*. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(1): p. 122-32.
115. Hauck, L., et al., *Regulation of E2F1-dependent gene transcription and apoptosis by the ETS-related transcription factor GABPgamma1*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(7): p. 2147-58.
116. Croxton, R., et al., *Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1*. *Oncogene*, 2002. **21**(9): p. 1359-69.
117. Bamford, S., et al., *The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website*. *Br J Cancer*, 2004. **91**(2): p. 355-8.
118. Romagosa, C., et al., *p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors*. *Oncogene*, 2011. **30**(18): p. 2087-97.
119. Munro, S., U. Oppermann, and N.B. La Thangue, *Pleiotropic effect of somatic mutations in the E2F subunit DP-1 gene in human cancer*. *Oncogene*, 2014. **33**(27): p. 3594-603.
120. Rosenfeldt, M.T., et al., *E2F1 drives chemotherapeutic drug resistance via ABCG2*. *Oncogene*, 2014. **33**(32): p. 4164-72.
121. Alla, V., et al., *E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(16): p. 3067-78.
122. Engelmann, D. and B.M. Putzer, *The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(3): p. 571-5.

123. Mans, D.A., et al., *Regulation of E2F1 by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein predicts survival in renal cell cancer patients*. J Pathol, 2013. **231**(1): p. 117-29.
124. Nauman, A., et al., *Elevated cyclin E level in human clear cell renal cell carcinoma: possible causes and consequences*. Acta Biochim Pol, 2007. **54**(3): p. 595-602.
125. Liang, B., J. Zhao, and X. Wang, *Clinical performance of E2Fs 1-3 in kidney clear cell renal cancer, evidence from bioinformatics analysis*. Genes Cancer, 2017. **8**(5-6): p. 600-607.
126. Ma, X., et al., *Overexpression of E2F1 promotes tumor malignancy and correlates with TNM stages in clear cell renal cell carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73436.
127. Ding, M., et al., *The E2F1-miR-520/372/373-SPOP Axis Modulates Progression of Renal Carcinoma*. Cancer Res, 2018. **78**(24): p. 6771-6784.
128. Gao, Y., et al., *KLF6 Suppresses Metastasis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Transcriptional Repression of E2F1*. Cancer Res, 2017. **77**(2): p. 330-342.
129. Zou, Y., et al., *ERK Inhibitor Enhances Everolimus Efficacy through the Attenuation of dNTP Pools in Renal Cell Carcinoma*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. **14**: p. 550-561.
130. Tian, W., F. Cui, and M.A. Esteban, *E2F1 in renal cancer: Mr Hyde disguised as Dr Jekyll?* J Pathol, 2013. **231**(2): p. 143-6.
131. Ebihara, Y., et al., *Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression*. Dis Esophagus, 2004. **17**(2): p. 150-4.
132. Mega, S., et al., *Cyclin D1, E2F1 expression levels are associated with characteristics and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma*. Dis Esophagus, 2005. **18**(2): p. 109-13.
133. Yamazaki, K., et al., *Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study*. Pathol Res Pract, 2003. **199**(1): p. 23-8.
134. Liu, Z.L., et al., *Expressions and prognostic values of the E2F transcription factors in human breast carcinoma*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 3521-3532.
135. Evangelou, K., et al., *E2F-1 overexpression correlates with decreased proliferation and better prognosis in adenocarcinomas of Barrett oesophagus*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 601-5.
136. Xiao, Q., et al., *Transcription factor E2F-1 is upregulated in human gastric cancer tissues and its overexpression suppresses gastric tumor cell proliferation*. Cell Oncol, 2007. **29**(4): p. 335-49.
137. Yin, Y.S., et al., *[Inhibitory effects of transcription factor E2F-1 siRNA on invasion and proliferation of gastric cancer cell line MGC803]*. Ai Zheng, 2008. **27**(9): p. 914-8.
138. Lee, J., et al., *Impact of E2F-1 expression on clinical outcome of gastric adenocarcinoma patients with adjuvant chemoradiation therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 82-8.
139. Banerjee, D., et al., *Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2365-7.
140. Farra, R., et al., *E2F1 as a molecular drug target in ovarian cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2019. **23**(3): p. 161-164.
141. Palaiologou, M., et al., *E2F-1 is overexpressed and pro-apoptotic in human hepatocellular carcinoma*. Virchows Arch, 2012. **460**(5): p. 439-46.
142. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of cell number in monolayer cultures*. Anal Biochem, 1986. **159**(1): p. 109-13.

143. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
144. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
145. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
146. Alessi, D.R., et al., *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. FEBS Lett, 1996. **399**(3): p. 333-8.
147. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
148. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
149. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. Cell, 1986. **47**(6): p. 921-8.
150. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappa B*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
151. Jhanwar-Uniyal, M., et al., *Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship*. Adv Biol Regul, 2019. **72**: p. 51-62.
152. Carrington, E.M., et al., *Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo*. Cell Death Differ, 2017. **24**(5): p. 878-888.
153. Wilkinson, S., et al., *The cyclin-dependent kinase PITSLRE/CDK11 is required for successful autophagy*. Autophagy, 2011. **7**(11): p. 1295-301.
154. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
155. Ahmed, R.L., et al., *CDK11 Loss Induces Cell Cycle Dysfunction and Death of BRAF and NRAS Melanoma Cells*. Pharmaceuticals (Basel), 2019. **12**(2).
156. Yun, X., et al., *CDK11(p58) protein kinase activity is associated with Bcl-2 down-regulation in pro-apoptosis pathway*. Mol Cell Biochem, 2007. **304**(1-2): p. 213-8.
157. Dar, A.A., et al., *miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 16606-14.
158. Wang, H., et al., *miR205 suppresses cell proliferation, invasion, and metastasis via regulation of the PTEN/AKT pathway in renal cell carcinoma*. Mol Med Rep, 2016. **14**(4): p. 3343-9.
159. Brodaczewska, K.K., et al., *Choosing the right cell line for renal cell cancer research*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 83.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle beim zuständigen Professor für die Möglichkeit bedanken, eine experimentelle Arbeit an seinem Institut unter Nutzung vieler Ressourcen durchgeführt haben zu dürfen.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin der Laborleiterin für ihre exzellente Betreuung während der gesamten Zeit. Sie war äußerst hilfsbereit, jederzeit für Fragen ansprechbar und sorgte mit ihrer Umsichtigkeit dafür, eine freundschaftlich-angenehme Arbeitsatmosphäre mit allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zu schaffen. Besonders möchte ich mich bei S. B. bedanken, die mich ausführlich in die Arbeitsabläufe eingewiesen hat und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Auch J. R. soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben. Durch ihre langjährige Erfahrung trat sie ein ums andere Mal bei Problemen in gewohnter Hilfsbereitschaft in Erscheinung. Ihre gut gelaunte und belebende Art übertrag sich dabei nicht selten auf mich selbst.

Danken möchte ich auch allen weiteren Mitarbeitern der AG für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und die vielen interessanten Gespräche.

Meine tief empfundene Dankbarkeit möchte ich meinen Eltern aussprechen. Sie haben mich während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit vorbehaltlos unterstützt und somit in erheblichem Maße dazu beigetragen, dass diese Arbeit überhaupt entstehen konnte. Umso schmerzlicher ist für mich die Tatsache, dass mein Vater die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr miterleben durfte.

Zuletzt möchte ich von Herzen meiner Verlobten danken. Ihre optimistische Grundhaltung war sehr motivierend und sie stand stets verständnisvoll an meiner Seite. Sie ist mir eine große Stütze.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Büntemeyer, Dr. med.

Vorname: Tjark-Ole

Geburtsdatum: 30.11.1988

Geburtsort: Rotenburg (Wümme)

Schule, Wehersatzdienst und Hochschulstudium

seit 02/2020 Assistenzarzt an der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen (Direktor: Prof. Dr. Dr. M. Kesting)

10/2015-10/2019 Studium der Zahnmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz – Approbation 10/2019

04/2009-05/2015 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und Universitätsspital Zürich/CH – Approbation 06/2015

08/2008-04/2009 Wehersatzdienst – Klinikum Region Hannover in Großburgwedel

07/1995-06/2008 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Großburgwedel – Abitur 06/2008

Humanmedizinische Dissertation

09/2013-02/2017 Wertigkeit der Leberresektion bei Metastasen des Nebennierenkarzinoms – Analyse anhand des Deutschen Nebennierenkarzinomregisters (Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universität Würzburg) – Promotion 12/2017

Publikationen

2017 Baur J, Büntemeyer TO, Megerle F, Deutschbein T, Spitzweg C, Quinkler M, Nawroth P, Kroiss M, Germer CT, Fassnacht M, Steger U; German Adrenocortical Carcinoma Study Group. Outcome after resection of Adrenocortical Carcinoma liver metastases: a retrospective study. BMC Cancer. 2017 Aug 4;17(1):522. doi: 10.1186/s12885-017-3506-z.