

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Re-Expression von Caspase-8
und
Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose
durch
Methotrexat**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefanie Wittmann

aus
München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Plesnila Priv. Doz. Dr. C.J. Bruns
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. H. Ehrhardt
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	26.07.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Hintergrund	6
1.2	Todesliganden und ihre Rezeptoren	6
1.3	TRAIL als potentielltes Tumorthapeutikum	7
1.4	TRAIL und seine Rezeptoren	8
1.5	Apoptosesignalweg	9
1.5.1	Bildung des Death Inducing Signaling Complex (DISC)	9
1.5.2	Caspasen	10
1.5.3	Extrinsischer und intrinsischer Signalweg	10
1.6	Regulatorische Proteine des Apoptosesignalwegs	14
1.7	Regulation der TRAIL-Sensitivität	15
1.8	Überwindung von Apoptoseresistenz durch sensitivierende Wirkung von Zytostatika auf die TRAIL-induzierte Apoptose	17
1.9	Fragestellung	22
2	MATERIALIEN UND METHODEN	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Zellkultur	23
2.1.2	Zytostatika und Stimulantien	23
2.1.2.1	Zytostatika	23
2.1.2.2	Stimulantien und Inhibitoren	23
2.1.3	TRAIL-Rezeptor Bestimmung	24
2.1.4	Proteinbestimmung	24
2.1.5	Proteinaseinhibitoren	24

2.1.6	Westernblot	24
2.1.7	Puffer	25
2.1.8	Sonstige Materialien	26
2.1.9	Geräte	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.1.1	Zelllinien	28
2.2.1.1.1	Leukämiezelllinien und adhärente Zellen	28
2.2.1.1.2	Primäre Patientenzellen	29
2.2.1.2	Stimulationsexperimente	29
2.2.1.2.1	Leukämiezelllinien und adhärente Zellen	29
2.2.1.2.2	Primäre Patientenzellen	32
2.2.1.3	Inhibitionsversuche	32
2.2.2	Apoptose-Messung	33
2.2.2.1	Durchflusszytometrie (FACscan)	33
2.2.2.2	Auswertung der FACs-Messungen	34
2.2.3	Bestimmung der TRAIL-Rezeptoren	35
2.2.4	Statistik	35
2.2.5	Zellyse	37
2.2.6	Proteinbestimmung	37
2.2.7	Western Blot	37
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Untersuchung von Leukämiezelllinien auf Auftreten und Häufigkeit einer Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch konventionelle Zytostatika	39

3.2	Untersuchung der sensitivierenden Wirkung von Methotrexat auf die Apoptoseinduktion durch TRAIL	43
3.2.1	TRAIL-resistente JURKAT Zellen	43
3.2.2	Ausweitung der Versuche auf andere Leukämiezelllinien und adhärente Zellen mit Verlust von Caspase-8 Protein	45
3.2.3	Untersuchung primärer kindlicher Leukämiezellen auf eine Sensitivierung durch Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose	47
3.3	Inhibition der Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch Methotrexat	51
3.4	Analyse von Proteinen der Apoptosesignalkaskade	53
3.4.1	Rezeptorebene	53
3.4.2	Western Blot Analyse intrazellulärer Proteine	54
3.5	Inhibition von Caspase-8	57
4	DISKUSSION	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	65
7	DANKSAGUNG	80
8	LEBENS LAUF	81

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Durch Fortschritte in Diagnose, Operationstechnik, Radio- und Chemotherapie konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit von Tumorpatienten in den letzten 50 Jahren entscheidend verbessert werden. Dennoch ist die Prognose vieler Patienten, insbesondere bei fortgeschrittener Tumorerkrankung, trotz optimierter Chemotherapie nicht zufriedenstellend. Viele Tumore zeigen sich primär resistent gegenüber konventionellen Zytostatika oder entwickeln sekundär Chemoresistenz in Folge vorangehender zytostatischer Behandlungen. Das Auftreten therapieresistenter Tumorzellen stellt eines der Hauptprobleme in der Therapie bösartiger Tumore dar.

Die meisten Chemotherapeutika, die heute in der Tumorthherapie eingesetzt werden, lösen in Tumorzellen Apoptose aus (Kaufmann *et al.*, 2000, Herr *et al.*, 2001). Apoptose oder auch physiologischer Zelltod ist, ebenso wie die Zellteilung, ein feinregulierter physiologischer Mechanismus, der nach einem festem Schema verläuft und deshalb auch durch den Begriff „programmierter Zelltod“ geprägt wird. Wyllie *et al.* beschreiben bereits 1980 die charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen apoptotischer Zellen. Stirbt eine Zelle durch Apoptose, kommt es zur Abnahme des Zellvolumens. Die Zelle schrumpft, Membran und Kernmembran stülpen sich ein und schnüren einzelne Zellteile voneinander ab. Die apoptotischen Zellkörperchen werden anschließend von Nachbarzellen phagozytiert und lysosomal abgebaut. Auf diese Weise wird die Zelle ohne Freisetzung entzündungsauslösender Moleküle aus dem Gewebe entfernt (Hengartner, 2000).

1.2 Todesliganden und ihre Rezeptoren

Todesliganden vermitteln nach Anbindung an ihre Rezeptoren ein Signal, welches über die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade zum Absterben der Zelle führt. Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ist das älteste und namensgebende Mitglied der TNF Familie, zu der auch CD95L und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gezählt werden. Todesliganden liegen in aktiver Form als Trimer vor und aktivieren ihren Rezeptor bei Bindung über korrespondierende

Rezeptormultimerisierung. Allen Todesrezeptoren ist eine spezielle zytoplasmatische Domäne gemeinsam, die aus circa 80 spezifischen Aminosäuren besteht. Diese sogenannte Todesdomäne oder Death Domain (DD) ist entscheidend an der Übermittlung des Todessignals von der Zelloberfläche an die ausführenden Proteine der Signalkaskade innerhalb der Zelle beteiligt. Zu den am besten charakterisierten Todesrezeptoren zählen CD95 (Apo-1/ Fas), TNF-R1 und TNF-R2 sowie TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Debatin und Kramer, 2004).

1.3 TRAIL als potentielles Tumorthapeutikum

Da Todesliganden in zahlreichen Tumorzellen effektiv Zelltod induzieren, sind die CD95, TNF und TRAIL Rezeptor-Liganden-Systeme als potentielle neue Therapeutika in der Tumorthherapie Gegenstand der Forschung. Erste Versuche mit TNF und CD95 *in vivo* zeigen jedoch enttäuschende Ergebnisse. Während TNF bei systemischer Gabe letale Entzündungsreaktionen hervorruft (Tartaglia *et al.*, 1992), führt CD95L zu massiver Apoptoseinduktion gesunder Hepatozyten (Ogasawara *et al.*, 1993). Aufgrund der starken Toxizität *in vivo* ist bisher weder das CD95- noch das TNF-System Bestandteil der klinisch eingesetzten Tumorthherapie.

Im Gegensatz zu CD95 und TNF hat die systemische Gabe von TRAIL bei Mäusen, Primaten und Menschen (Phase I Studie) kaum Nebenwirkungen zur Folge (Ashkenazi *et al.*, 1999, Walczack *et al.*, 1999, Buchsbaum *et al.* 2006). Zahlreiche Studien *in vitro* zeigen, dass TRAIL in Tumorzellen verschiedensten Ursprungs effektiv Apoptose induziert (Kaufmann und Steensma, 2005). In Maus Xenograft Modellen unterschiedlicher Tumorarten führt TRAIL zu vermindertem Wachstum und Tumorregression (Walczack *et al.*, 1999, Fischer und Schulze-Osthoff, 2005). Seitdem bekannt ist, dass sich die zelltodinduzierende Wirkung von TRAIL auf Tumorzellen beschränkt, die meisten normalen Zellen jedoch TRAIL-resistent zu sein scheinen, gilt TRAIL als vielversprechendes neues Tumorthapeutikum (Fulda und Debatin, 2004). Dennoch kann eine mögliche toxische Wirkung von TRAIL auf normale Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden (Jo *et al.*, 2000, Nitsch *et al.*, 2000). Untersuchungen zeigen, dass die Zytotoxizität in Abhängigkeit des jeweils verwendeten TRAIL-Derivats variiert (Le Blanc und Ashkenazi, 2003). Im Gegensatz zu den an FLAG oder Polyhistidin gekoppelten TRAIL-Derivaten erweist sich die native, Zink-gebundene homotrimere Form an menschlichen Hepatozyten und Keratinozyten *in vitro* als nicht toxisch (Lawrence *et al.*, 2001, Qin *et al.*, 2001).

TRAIL scheint, insbesondere in seiner nativen ungekoppelten Form, ein wenig toxisches und vielversprechendes neues Therapeutikum zu sein, das in zahlreichen Tumorzelllinien *in vitro* sowie Tumor Xenografts *in vivo* potent Apoptose induziert. In der klinischen Forschung befinden sich derzeit ebenso agonistische Antikörper gegen die TRAIL-Rezeptoren (U.Fischer und K. Schulze-Osthoff, 2005).

1.4 TRAIL und seine Rezeptoren

TRAIL ist, wie die meisten Mitglieder der TNF Familie, ein Typ II Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne durch Metalloproteasen abgespalten wird. TRAIL induziert sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form Apoptose (Held und Schulze-Osthoff, 2001). Aktives TRAIL liegt als Homotrimer vor und bindet drei Rezeptormoleküle. An jeder Untereinheit des trimeren Proteins ist ein Zink-Ion gebunden, welches entscheidend zur Stabilität und optimalen biologischen Aktivität des Liganden beiträgt (Bodmer *et al.*, 2000). Bisher sind 5 verschiedene Rezeptoren beschrieben, an die TRAIL anbindet (Abbildung 1-1). Die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne (death domain, DD) und sind somit in der Lage, nach Ligandenbindung ein Todessignal zu übermitteln. Im Gegensatz dazu können die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) aufgrund einer funktionslosen bzw. fehlenden DD in der Zielzelle keinen Zelltod auslösen (Almasan und Ashkenazi, 2003). Es wird vermutet, dass Rezeptoren ohne zelltodauslösende Funktion als sogenannte „Decoy“ Rezeptoren wirken und mit den apoptoseinduzierenden Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 um Liganden konkurrieren (Srivastava, 2001). Der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) bindet TRAIL, weist aber im Vergleich zu den übrigen TRAIL-Rezeptoren nur geringe Affinität zum Liganden auf und scheint primär an der Regulation der Osteoklastogenese beteiligt zu sein (Emery *et al.*, 1998).

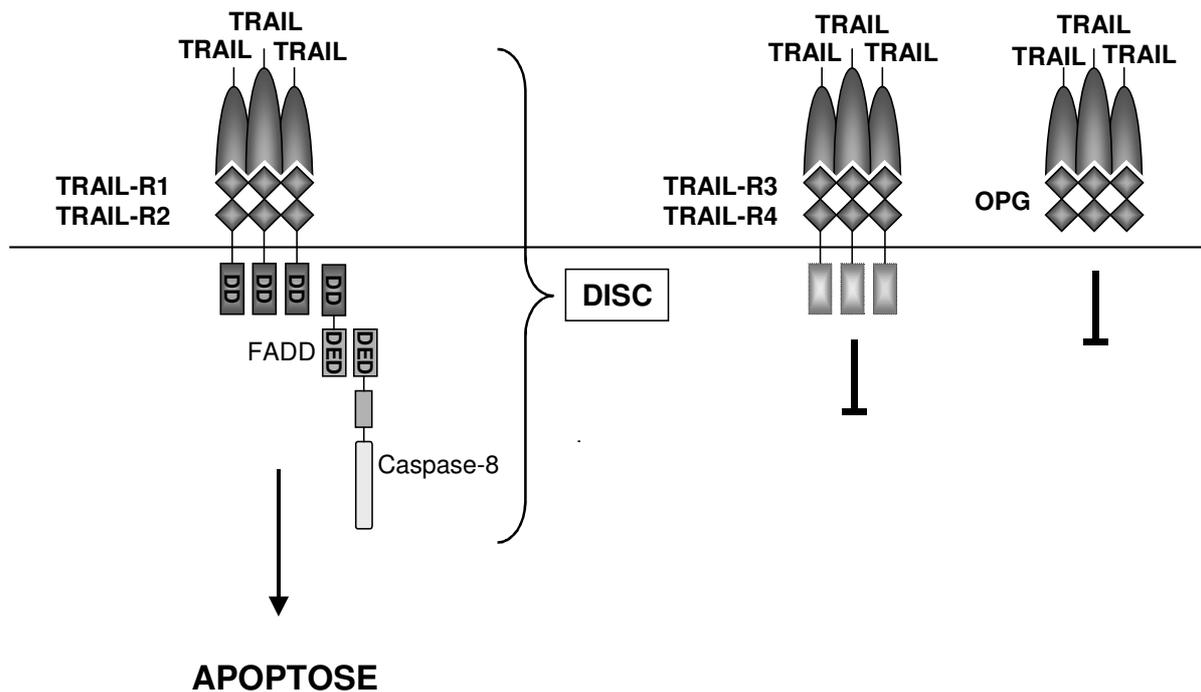


Abbildung 1-1: TRAIL, seine Rezeptoren und die Bildung des DISC

Die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 besitzen eine intrazelluläre death domain (DD) über die sie ein Todessignal weitergeben. Bindung eines trimeren Ligandenproteins führt zu Rezeptortrimerisierung und Anlagerung des Adaptermoleküls FADD an die intrazelluläre DD des Rezeptors. Caspase-8 besitzt eine death effector domain (DED), mit der sie an die korrespondierende DED von FADD bindet und durch Approximierung aktiviert wird. Die Decoy Rezeptoren TRAIL-R3 und -R4 (DcR1 und DcR2), sowie Osteoprotegerin (OPG) können aufgrund einer fehlenden oder funktionslosen DD kein Todessignal in Zellinnere übermitteln.

1.5 Apoptosesignalweg

1.5.1 Bildung des Death Inducing Signaling Complex (DISC)

TRAIL löst in der Zielzelle Apoptose aus, indem es an TRAIL-Rezeptoren anbindet, die in der Lage sind, mittels ihrer DD ein Todessignal zu vermitteln und die Signalkaskade zu aktivieren. Dazu gehören die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Zur Stimulation der Zelle lagert sich ein trimeres Ligandenprotein an den Rezeptor, was an der Zellmembran zur Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors mit Bildung eines Proteinkomplexes, des sogenannten death inducing signaling complex (DISC) führt (Abbildung 1-1). Dabei kommt es zur Anlagerung des Adaptermoleküls Fas-associated polypeptide with death domain (FADD) an die intrazelluläre DD des Rezeptors. FADD besitzt neben der DD eine als death effector domain (DED) bezeichnete Sequenz, an die Caspasen binden können, die ebenfalls

eine DED besitzen. Durch Protein-Protein Interaktion kommt es zu autokatalytischer Spaltung und Aktivierung von Caspase-8, die ihrerseits Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) spalten und aktivieren kann. Es wurde gezeigt, dass nicht nur Caspase-8, sondern auch Caspase-10, die ebenfalls eine DED besitzt, an den DISC gebunden wird (Walczak und Sprick, 2001) und zelltypspezifisch Caspase-8 ersetzen kann (Kischkel *et al.*, 2001).

1.5.2 Caspasen

Nach Anbinden eines Todesliganden an den Rezeptor und Bildung des DISC wird das Todessignal mit Hilfe des zwischengeschalteten Adaptermoleküls FADD durch spezifische intrazelluläre Proteasen vermittelt. Aufgrund des Cystin im aktiven Zentrum sowie der Eigenschaft, Substrate an ihrem Aspartatrest zu spalten, werden diese Proteasen auch Caspasen genannt. Bisher sind 11 menschliche Caspasen mit unterschiedlicher Substratspezifität beschrieben, die an der Ausführung von Apoptose beteiligt sind. Caspasen werden in Form inaktiver Proenzyme synthetisiert und durch proteolytische Spaltung von anderen Caspasen oder autokatalytisch über regulierte Protein-Protein Interaktionen aktiviert (Hengartner *et al.*, 2000).

Basierend auf ihrer Anordnung in der Apoptosesignalkaskade werden zwei Arten von Caspasen unterschieden. Initiator-Caspasen, wie Caspase-8 (FLICE), -9 und -10 übernehmen regulatorische Funktionen und werden autokatalytisch durch Bindung an spezielle signalübermittelnde Proteine aktiviert. Sie spalten und aktivieren Caspasen, die weiter distal in der Signalkaskade lokalisiert sind. Da die distalen Caspasen verschiedenste strukturgebende Proteine (Fodrin, Actin) sowie Substrate (Caspaseaktivierte DNase (CAD)) spalten, die schließlich zum Abbau der Zelle führen, werden diese Caspasen auch Effektor-Caspasen genannt. Zu dieser Gruppe gehören die Caspasen -3, -6, und -7 (Thornberry *et al.*, 1998, Fischer *et al.*, 2003).

1.5.3 Extrinsischer und intrinsischer Signalweg

Grundsätzlich gibt es zwei Signalwege, über die Apoptose in der Zielzelle ausgelöst werden kann (Abbildung 1-2). TRAIL und andere Todesliganden der TNF-Familie induzieren Zelltod über den sogenannten extrinsischen Signalweg. Dabei kommt es nach Anlagerung von TRAIL an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 zur Bildung des DISC an der Zelloberfläche, Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10 und darauffolgende

direkte Aktivierung verschiedener Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7), die zelluläre Proteine spalten und so zum Absterben der Zelle führen.

Im Gegensatz dazu wird nach Schädigung der DNA, beispielsweise durch zytostatische Therapie oder γ -Strahlung, Apoptose über den intrinsischen Signalweg ausgelöst (Rich *et al.*, 2000). Im Verlauf dieses Signalweges spielt das Mitochondrium eine wichtige Rolle. Nach Verringerung des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\psi$) werden Cytochrom c sowie der Apoptoseinduzierende Faktor (AIF) und second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI (Smac/DIABLO) in das Zytosol der Zelle freigesetzt (Green und Kroemer, 2004). Dort lagert sich Cytochrom c mit ATP sowie apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), einem weiteren Adaptermolekül, zu einem Proteinkomplex zusammen, dem Apoptosom. Die erfolgreiche Bildung des Apoptosoms führt zur Rekrutierung der Initiator-Caspase-9 an den Apoptosom-Komplex. Durch Protein-Protein Interaktion wird Caspase-9 aktiviert und kann nachfolgende Effektor-Caspasen (Caspase-3, -7) durch Spaltung aktivieren (Hengartner, 2000). AIF induziert parallel Caspase-unabhängig Apoptose, während Smac an das regulatorische Protein XIAP (X-linked IAP; vgl. 1.6) anbindet und dessen apoptosehemmende Wirkung auf Caspase-3 und -9 antagonisiert (Kaufmann und Steensma, 2005).

Todesliganden lösen Zelltod nicht nur über den extrinsischen Signalweg mittels direkter Aktivierung von Caspasen aus, sondern können Apoptose in einigen Zelllinien auch unter Einbeziehung des Mitochondriums induzieren. Über Bid, einem proapoptotischen Mitglied der B-cell lymphoma/leukemia protein-2 (Bcl-2) Familie (vgl. 1.6), stehen extrinsischer und intrinsischer Signalweg miteinander in Verbindung. Bid, welches in inaktiver, ungespaltener Form im Zytosol vorliegt, wird nach Rezeptorstimulation durch Caspase-8 gespalten. Daraufhin transloziert Bid vom Zytosol zum Mitochondrium und führt dort zur Abnahme des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\psi$) mit Freisetzung von Cytochrom c und nachfolgender Bildung des Apoptosom-Komplexes (Kroemer und Reed, 2000). Ein rezeptorvermitteltes, extrinsisches Todessignal kann auf diese Weise durch die Beteiligung des intrinsischen, mitochondrialen Signalweges verstärkt werden. Die Abhängigkeit einer Zelle von der Verstärkung des apoptotischen Signals variiert zwischen den verschiedenen Zelllinien (Wang und El-Deiry, 2003). So ist die Existenz zweier Zelltypen nachgewiesen, die sich in ihrer Abhängigkeit vom mitochondrialen

Signalweg unterscheiden (Scaffidi *et al.*, 1998, Burns und El-Deiry, 2001, Ozoren und El-Deiry, 2002). Während es in Typ I Zellen zu starker Aktivierung von Caspase-8 im DISC und nachfolgender Spaltung der Effektor-Caspasen unter Umgehung des Mitochondriums kommt, wird in Typ II Zellen Caspase-8 nur unzureichend aktiviert. Geringe Mengen aktiver Caspase-8 sind in diesen Zellen jedoch ausreichend, um über die Aktivierung des Mitochondriums und nachfolgende Spaltung von Caspase-3, -6 und -7 sowie über einen Feedback Loop mit weiterer Spaltung von Caspase-8 Zelltod zu induzieren.

Viele Zytostatika wirken primär über den intrinsischen Signalweg (Debatin, 2004). Zelltypspezifisch spielt jedoch auch der extrinsische rezeptorvermittelte Signalweg eine Rolle bei der Induktion von Zelltod durch Chemotherapeutika (Friesen *et al.*, 1996, Fulda *et al.*, 2001).

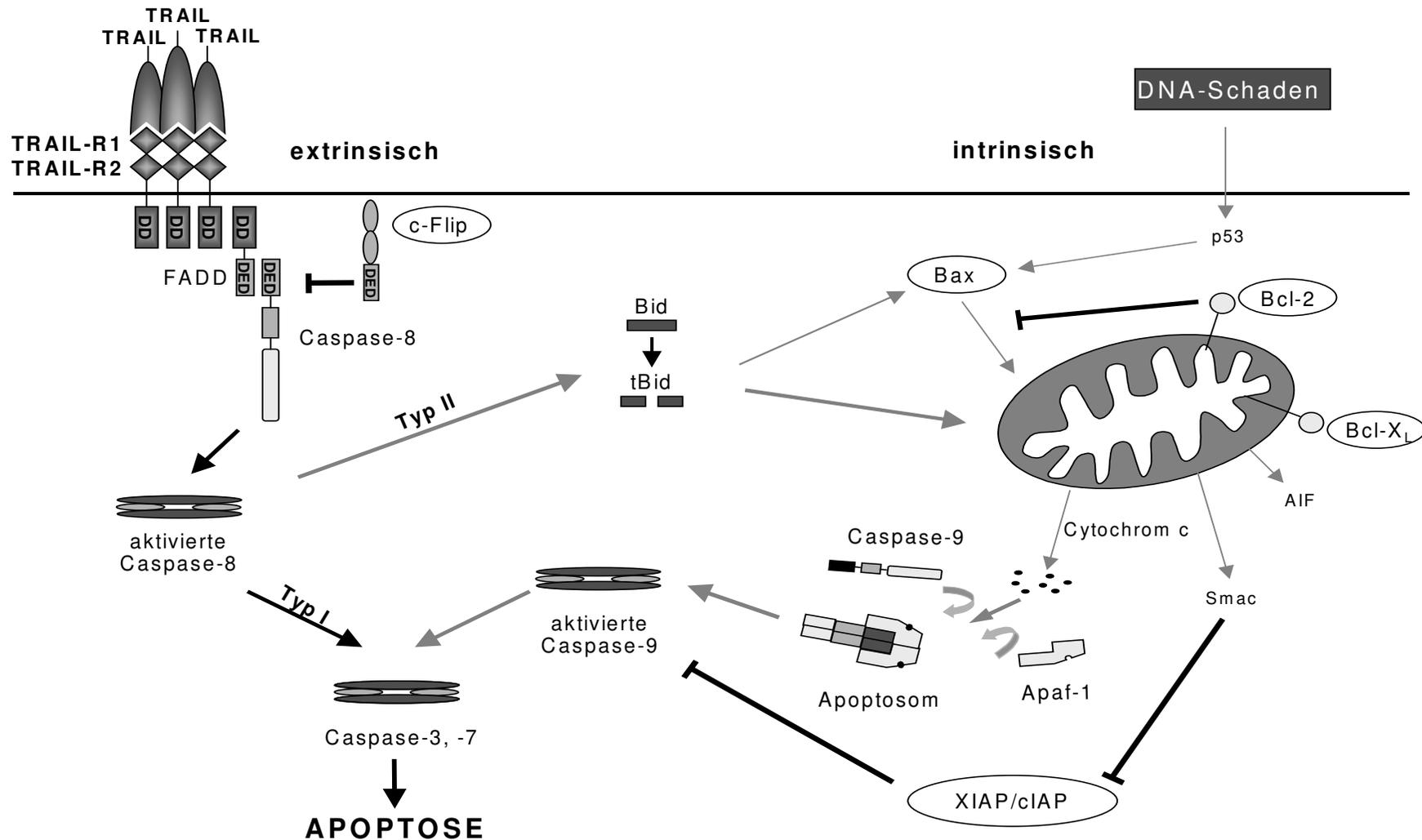


Abbildung 1-2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg

Anlagerung von TRAIL an den Rezeptor führt über den extrinsischen Signalweg zur Spaltung und Aktivierung von Caspase-8 und direkter Aktivierung der Effektor-Caspasen -3 und -7 (schwarze Pfeile). Schädigung der DNA löst Apoptose über den intrinsischen Signalweg aus (graue Pfeile). Dabei kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und Aktivierung der Effektor-Caspasen -3 und -7 über den Apoptosom-Komplex (Cytochrom c, Apaf-1, ATP, Caspase-9). Über Bid stehen extrinsischer und intrinsischer Signalweg in Verbindung. In Typ II Zellen wird ein rezeptorvermitteltes Todessignal durch Aktivierung des Mitochondriums über Bid verstärkt. Die Aktivierung von Caspasen kann durch FLIP, anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bcl-2 oder Bcl-X_L sowie durch Mitglieder der IAP Familie, wie cIAP-1/-2 oder XIAP, negativ reguliert werden. Bid wird über Caspase-8 aktiviert und führt zur Aktivierung proapoptotischer Bcl-2 Proteine, wie Bax und Bak, an der äußeren Mitochondrienmembran.

1.6 Regulatorische Proteine des Apoptosesignalwegs

Verschiedene Klassen von Proteinen beeinflussen den Apoptosesignalweg an entscheidenden Stellen positiv oder negativ, beispielsweise bei der Bildung des DISC und nachfolgenden Aktivierung von Caspase-8, am Mitochondrium oder bei der Spaltung und Aktivierung von Effektor-Caspasen (Abbildung 1-2).

Da die Zelltodinduktion über Todesrezeptoren von der vollständigen DISC-Bildung und einer funktionstüchtigen Caspase-8 abhängt, wird die Weitergabe des Todessignals an dieser Stelle verhindert. FADD-like interleukin-1-converting enzyme-inhibitory protein (FLIP) weist Caspase-8 homologe Sequenzen auf, besitzt aber im Gegensatz zu Caspase-8 keine Proteaseaktivität, da entscheidende katalytische Reste fehlen (Krueger *et al.*, 2001). FLIP wird anstelle von Caspase-8 an den DISC gebunden und blockiert auf diese Weise die Übermittlung des Todessignals an weiter distal gelegene Moleküle des Signalwegs.

Das Mitochondrium ist eine weitere wichtige Stelle, an der regulatorische Proteine auf die Zelltodinduktion einwirken. Dabei spielen die Mitglieder der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle. Über ihre Lokalisation in der Mitochondrienmembran sind sie in der Lage, die Apoptoseinduktion positiv oder negativ zu beeinflussen. Pro-apoptotische Proteine, wie Bcl-2-associated X protein (Bax), welches in inaktiver Form im Zytosol vorliegt und das lose ans Mitochondrium gebundene Homolog Bcl-2 antagonist/killer (Bak) translozieren bei Aktivierung zur äußeren Mitochondrienmembran. Dort bilden sie Poren-ähnliche Strukturen, über die Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt wird (Hengartner, 2000). Die Aktivierung von Bax und Bak kann von Bid, einem weiteren pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie, getriggert werden (Kaufmann und Steensma, 2005). Bid wird von Caspase-8 durch Spaltung aktiviert und fungiert so als wichtiges Verbindungsglied zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg. Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bcl-2 und Bcl-x_L, wirken als Gegenspieler der pro-apoptotischen Proteine indem sie die Freisetzung von Cytochrom c direkt am Mitochondrium blockieren (Kroemer und Reed, 2000) und so die Bildung des Apoptosoms zur Aktivierung von Caspase-9 verhindern.

Während FLIP in erster Linie den rezeptorvermittelten Zelltod beeinflusst und die Mitglieder der Bcl-2 Familie Apoptose primär über ihre Wirkung am Mitochondrium regulieren, hemmen die Mitglieder der IAP-Familie (inhibitor of apoptosis protein)

beide Signalwege, indem sie Caspasen über direkte Bindung antagonisieren. IAPs wie XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin binden an die Initiator-Caspase-9 und die Effektor-Caspasen –3 und –7 und hemmen diese in ihrer Funktion (Salvesen *et al.*, 2002).

1.7 Regulation der TRAIL-Sensitivität

Während TRAIL auf vielen primären Tumorzellen und Tumorzelllinien mehr oder weniger effektiv Apoptose auslöst, ist bei normalen Zellen keine zelltodinduzierende Wirkung nachgewiesen. Bisher sind die zugrundeliegenden Mechanismen für die tumorspezifische Wirkung von TRAIL bzw. die TRAIL-Resistenz einiger Tumorzelllinien nicht eindeutig geklärt. Es wird heute angenommen, dass die Sensitivität einer Zelle für die Apoptoseinduktion durch TRAIL auf verschiedenen Ebenen des Signalwegs, beispielsweise über die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche oder das Verhältnis von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Molekülen innerhalb der Zelle, beeinflusst wird (Held und Schulze-Osthoff, 2001).

Aufgrund der entscheidenden Rolle, die Caspasen bei der Übermittlung des apoptotischen Signals übernehmen, ist ein funktionstüchtiges Caspasen-System ein wichtiger Faktor dafür, ob TRAIL nach Anbindung an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 Zelltod induziert. Studien an knock-out Mäusen zeigen, dass insbesondere Caspase-8 eine zentrale Bedeutung bei der Induktion von Zelltod zukommt (Varfolomeev *et al.*, 1998). Versuche mit verschiedenen Caspase-8 defizienten Zelllinien *in vitro* und *in vivo* ergeben Hinweise auf den direkten Zusammenhang von TRAIL-Resistenz und dem Verlust von Caspase-8 (Ehrhardt *et al.*, 2003, Eggert *et al.*, 2001, Grotzer *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001, Zuzak *et al.*, 2001). Apoptoseresistenz kann jedoch nicht nur bei Verlust oder reduzierter Expression von Apoptosemolekülen entstehen, sondern auch durch Überwiegen anti-apoptotischer Signale wie beispielsweise FLIP (Hernandez *et al.*, 2001) oder verschiedener Mitglieder der IAP-Familie (Debatin und Kramer, 2004).

Nuclear Factor κ B (NF κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der über Bindung an die DNA die Transkription verschiedenster Gene induziert. Darunter befinden sich zahlreiche Gene, die anti-apoptotische oder proliferationsfördernde Proteine codieren, wie FLIP, einige Mitglieder der IAP Familie und Bcl-x_L (Karin *et al.*, 2002). TRAIL selbst aktiviert nach Bindung an den Rezeptor über das Adaptermolekül RIP NF κ B (Lin *et al.*, 2000, Di Pietro und Zauli, 2004) und schützt die Zellen über eine vermehrte

Expression anti-apoptotischer Proteine vor der Apoptoseinduktion, insbesondere wenn die Signalkaskade durch ein fehlendes oder funktionsloses Protein unterbrochen ist. Die Stimulation mit TRAIL führt auf diesen Tumorzellen über die Aktivierung von NF κ B zu erhöhten Überlebensraten und Proliferation (Ehrhardt *et al.*, 2003, Baader *et al.*, 2005) (Abbildung 1-3).

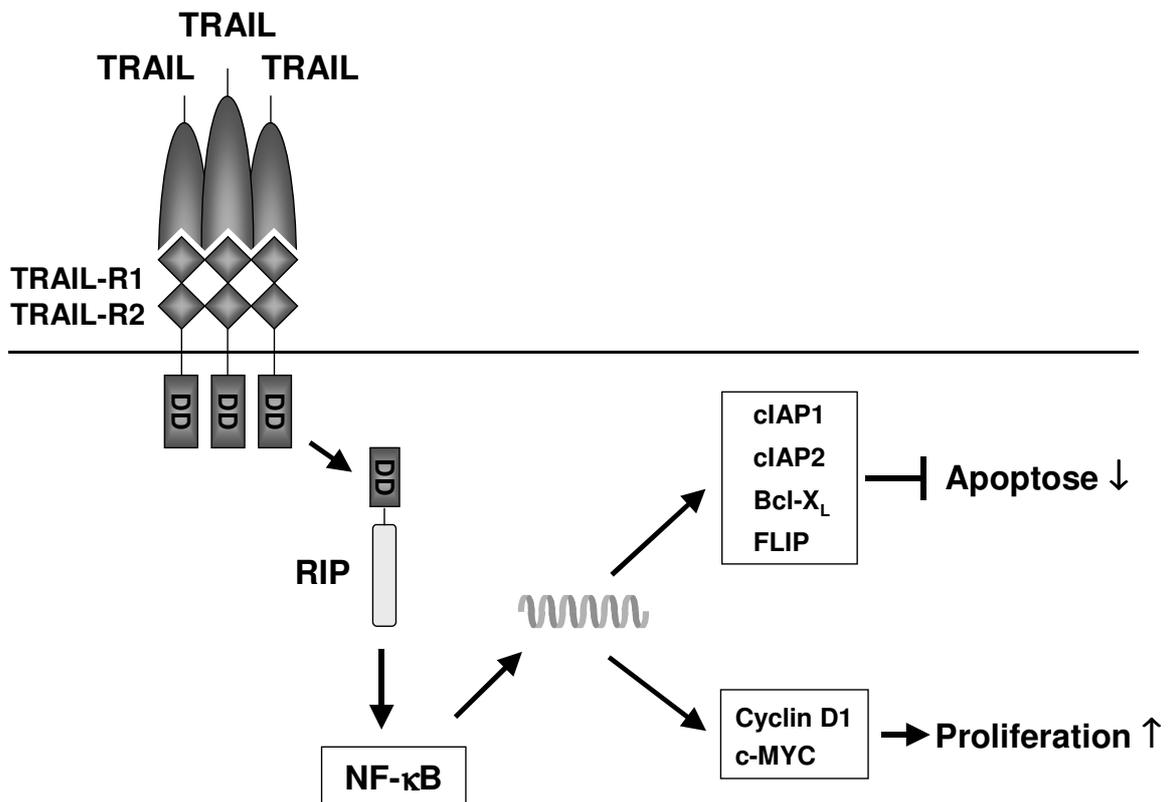


Abbildung 1-3: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch TRAIL

TRAIL aktiviert über das Adaptermolekül RIP den Transkriptionsfaktor NF κ B und induziert die Transkription verschiedener Gene, die anti-apoptische oder proliferationsfördernde Proteine codieren. Insbesondere bei unterbrochener Signalkaskade, wie beispielsweise in Caspase-8 negativen Zellen, führt die Stimulation mit TRAIL so zu verstärktem Überleben und sogar Proliferation der Tumorzellen.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der die Apoptose-Sensitivität einer Zelle über die Induktion regulatorischer Proteine beeinflussen kann, ist der Tumorsuppressor p53. p53 wird bei Schädigung der DNA, wie zum Beispiel durch Zytostatika oder γ -Strahlung, aktiviert und induziert zahlreiche pro-apoptische Proteine, darunter Bax und Bid, sowie den TRAIL-Rezeptor TRAIL-R2 (Fridmann und Lowe, 2003). p53 löst auf diese Weise direkt Zelltod aus oder verstärkt die Apoptoseinduktion durch TRAIL indirekt über die vermehrte Expression des pro-apoptischen TRAIL-Rezeptors TRAIL-R2. Mehr als die Hälfte aller menschlichen Tumore weist Mutationen auf, die

zur Inaktivität des p53 Tumorsuppressors führen (Nagane *et al.*, 2001). Da vor allem Zytostatika auf ein intaktes p53 angewiesen sind, um in Tumorzellen Apoptose auszulösen, ist dessen Aktivitätszustand ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Chemoresistenz. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung des rezeptorvermittelten Signalwegs durch TRAIL nicht an ein funktionstüchtiges p53 gekoppelt (Wang und El-Deiry, 2003).

1.8 Überwindung von Apoptoseresistenz durch sensitivierende Wirkung von Zytostatika auf die TRAIL-induzierte Apoptose

Das Auftreten von Resistenz gegenüber zytostatischer Therapie ist immer noch eines der Hauptprobleme in der Therapie bösartiger Tumore. Eine mögliche Ursache für die Ausbildung von Apoptose-Resistenz sind Veränderungen im Zelltodsignalweg der Tumorzellen (Rodriguez-Nieto und Zhivotovsky, 2006). Dabei kann es zu Verlust oder verminderter Expression pro-apoptischer Moleküle oder Überexpression anti-apoptischer Proteine kommen.

Ein wichtiges pro-apoptisches Protein, welches bei Verlust oder zu geringer Expression zur Entwicklung von Apoptoseresistenz mit verstärkter Tumorprogression und schlechter Prognose des Patienten führt, ist Caspase-8 (Pingoud-Meier *et al.*, 2003, Soung *et al.* 2005). Der Caspase-8 Status stellt einen wichtigen Faktor für die Ausbildung von Chemoresistenz bzw. die Voraussage der Überlebenswahrscheinlichkeit oder die Entwicklung eines Rezidivs dar. Abbildung 1-4 gibt einen Überblick über die zentrale Rolle von Caspase-8 bei der Apoptoseinduktion. Verminderte oder fehlende Caspase-8 Expression ist bei verschiedensten Tumorzellen nachweisbar. Meist ist der Verlust durch Hypermethylierung des Promotors bedingt und durch Azacythidin, eine demethylierende Substanz, revertierbar (Eggert *et al.*, 2001, Fulda *et al.*, 2001, Grotzer *et al.*, 2000, Teitz *et al.*, 2000). INF γ , ein physiologisches Zytokin, ist eine weitere Substanz, die über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und IRF-1 zu einer Re-expression von Caspase-8 in defizienten Zellen führt (Fulda *et al.*, 2002, Ruiz-Ruiz *et al.*, 2004). Beide Substanzen sind jedoch aufgrund ihrer ausgeprägten klinischen Nebenwirkungen nur bedingt therapeutisch einsetzbar.

Methotrexat ist ein seit langem in vielen klinischen Studien erfolgreich eingesetztes Zytostatikum. Es wirkt primär über die Hemmung der Dihydrofolatreduktase und führt so zu einer verminderten Bildung von Thymidin und reduzierter de novo Synthese

von Purinen mit konsekutiver Inhibition der DNA Replikation (Estlin *et al.*, 2000). Weitere bisher beschriebene Wirkungsmechanismen umfassen die Hemmung verschiedener Enzyme, Zytokine und Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NFκB. Der genaue intrazelluläre Signalweg, über den Methotrexat in Zellen Apoptose auslöst, ist heute jedoch noch nicht vollständig verstanden.

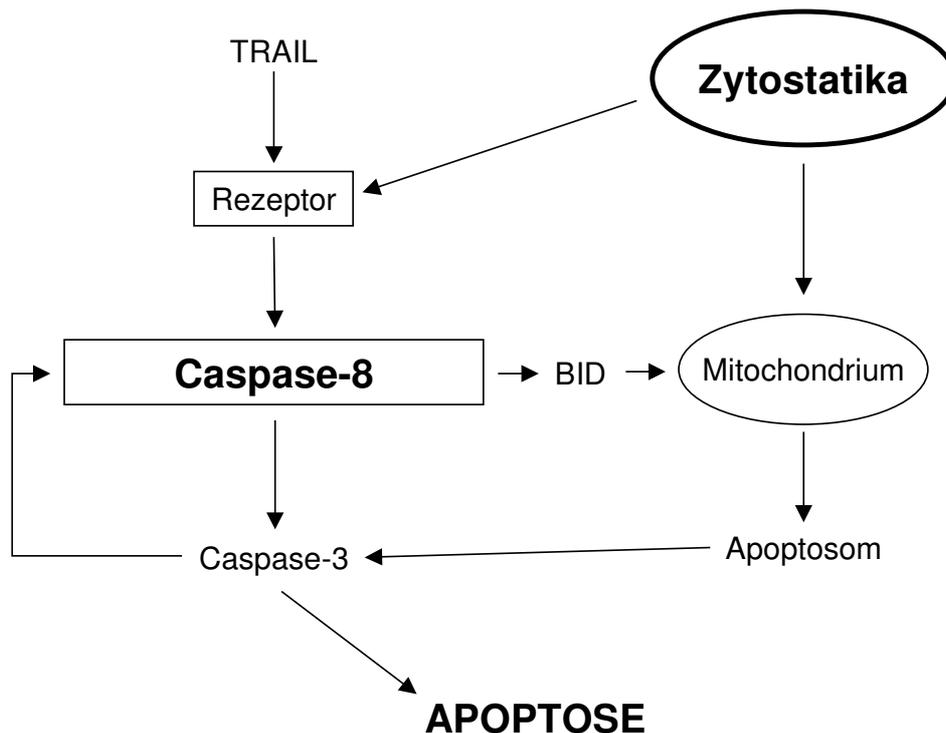


Abbildung 1-4: Zentrale Rolle von Caspase-8 bei der Induktion von Apoptose

TRAIL induziert Apoptose über Bindung an spezifische Rezeptoren, Bildung des TRAIL DISC und Aktivierung von Caspase-8. Aktivierte Caspase-8 aktiviert Caspase-3 sowie weitere Effektor-Caspasen in Typ I Zellen und spaltet Bid in Typ II Zellen. Bid führt am Mitochondrium zur Freisetzung von Cytochrom c, welches über die Bildung des Apoptosom-Komplexes zur Aktivierung von Caspase-9 und konsekutiver Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 führt. Caspase-3 kann nun Caspase-8 retrograd aktivieren und das Todessignal so verstärken oder weitere Substrate spalten, die den Zelltod herbeiführen. Zytostatika lösen Zelltod über Aktivierung des mitochondrialen oder des rezeptorvermittelten Signalwegs aus.

TRAIL ist ein neues Zytostatikum, welches sich bereits in der Phase II der klinischen Erprobung befindet. Derzeit wird intensiv untersucht, wie sich TRAIL als zusätzlicher Bestandteil einer Polychemotherapie auswirken könnte. Relativ viele primäre Tumorzellen und insbesondere solide Tumorzelllinien sprechen nicht oder nur ungenügend auf eine Behandlung mit TRAIL an. Die Kombination eines Standardtherapeutikums der Tumorthherapie mit TRAIL führt jedoch vor allem auf soliden Tumoren in vielen Fällen zu einer höheren Zelltodinduktion, als es die

Wirkung jeder Substanz alleine erwarten lässt. Bisher sind verschiedenste Mechanismen für die verbesserte Wirkung einer Kombinationstherapie beschrieben, darunter die verminderte Expression anti-apoptotisch wirkender Proteine oder die Hochregulation pro-apoptotischer Proteine (Tabelle 1-1).

Molekularer Mechanismus	Zytostatikum	Zelllinie	Literaturangabe
Verstärkte Expression von DR4	DXR, VP-16 γ-IR CDDP	Mammakarzinom Leukämie Hepatozell.-Karzinom	Morgan <i>et al.</i> , 2002 Di Pietro <i>et al.</i> , 2001 Shin <i>et al.</i> , 2002
Verstärkte Expression von DR5	CPT, CDDP, UV γ-IR γ-IR TO γ-IR ADR CDDP, VP-16 CPT-11 DXR CPT-11, VP16 AraC, DXR, VP-16	Glioblastom Leukämie Mammakarzinom Nierenkarzinom Leukämie Multiples Myelom Glioblastom Kolonkarzinom Sarkom Kolonkarzinom Leukämie	Arizono <i>et al.</i> , 2003 Belka <i>et al.</i> , 2001 Chinnaiyan <i>et al.</i> , 2000 Dejosez <i>et al.</i> , 2000 Gong <i>et al.</i> , 2000 Jazirehi <i>et al.</i> , 2001 Nagane <i>et al.</i> , 2000 Naka <i>et al.</i> , 2002 Tomek <i>et al.</i> , 2003 Wang <i>et al.</i> , 2003 Wen <i>et al.</i> , 2000
Verstärkte Expression von DR4&DR5	CDDP, DXR, VP-16 CDDP, DXR, VP-16 VP-16 TO CHL, FLU PA ADR, CPT, VP-16, PA, VCR, VBL CPT-11 CDDP ADR CPT-11	Osteosarkom Osteosarkom Mammakarzinom Prostatakarzinom Leukämie Prostatakarzinom Mammakarzinom Prostatakarzinom Ovarialkarzinom Nierenkarzinom Kolonkarzinom	Bouralexis <i>et al.</i> , 2003 Evdokiou <i>et al.</i> , 2001 Gibson <i>et al.</i> , 2000 Griffith <i>et al.</i> , 2003 Johnston <i>et al.</i> , 2003 Nimmanapalli <i>et al.</i> , 2001 Singh <i>et al.</i> , 2003 Ray <i>et al.</i> , 2003 Siervo-Sassi <i>et al.</i> , 2003 Wu <i>et al.</i> , 2003 Xiang <i>et al.</i> , 2002

Verminderte Expression von IAP	TO CDDP, VP-16 AraC, VP-16	Prostatakarzinom Glioblastom Leukämie	Griffith <i>et al.</i> , 2003 Roa <i>et al.</i> , 2003 Wen <i>et al.</i> , 2000
Verminderte Expression von FLIP	CDDP DXR 5-FU CDDO CDDP CDDP, DXR, VP-16 5-FU	Osteosarkom Prostatakarzinom Kolonkarzinom Leukämie Melanom Osteosarkom Hepatozell.-Karzinom	Hotta <i>et al.</i> , 2003 Kelly <i>et al.</i> , 2002 Lacour <i>et al.</i> , 2003 Suh <i>et al.</i> , 2003 Song <i>et al.</i> , 2003 van Valen <i>et al.</i> , 2003 Ganten <i>et al.</i> , 2004
Verminderte Expression von Bcl-2/-X _L	ADR, CDDP CPT-11 CDDP	Epitheliale Tumore Prostatakarzinom Ovarialkarzinom	Ohtsuka <i>et al.</i> , 2003 Ray <i>et al.</i> , 2003 Siervo-S. <i>et al.</i> , 2003
Verstärkte Expression von Bax/Bak	VP-16 CDDP 5-FU CPT-11 CDDP 5-FU	Kolonkarzinom Blasenkarzinom Nierenkarzinom Prostatakarzinom Ovarialkarzinom Prostatakarzinom	Miao <i>et al.</i> , 2003 Mizutani <i>et al.</i> , 2001 Mizutani <i>et al.</i> , 2002 Ray <i>et al.</i> , <i>et al.</i> , 2003 Siervo-S. <i>et al.</i> , 2003 Von Haefen <i>et al.</i> , 2004
Verstärkte Cytochrom c Freisetzung	CDDP, DXR, VP-16, GEM CCNU	Mesotheliom Glioblastom	Liu <i>et al.</i> , 2001 Röhn <i>et al.</i> , 2001

ADR: Adriamycin, AraC: Cytarabin, CCNU: Lomustin, CDDO: 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic Acid, CDDP: Cisplatin, CPT: Camptothecin, CPT-11: Irinotecan, CHL: Chlorambucil, DXR: Doxorubicin, FLU: Fludarabin, 5-FU: Fluoruracil, GEM: Gemcitabin, PA: Paclitaxel, TO: Topotecan, VBL: Vinblastin, VCR: Vincristin, VP-16: Etoposid, γ R: γ -Bestrahlung

Tabelle 1-1: Sensitivierende Wirkung verschiedener Zytostatika für die TRAIL-induzierte Apoptose

1.9 Fragestellung

Der Verlust von Caspase-8 ist ein häufiger Grund für die TRAIL-Resistenz verschiedenster Tumore. Fehlt Caspase-8, hat TRAIL eine unerwünschte anti-apoptotische Wirkung auf die Tumorzellen, welche sogar zu verstärkter Proliferation der Zellen führt.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb erstmals die sensitivierende Wirkung von Zytostatika der aktuellen Standardtherapieprotokolle für die TRAIL-induzierte Apoptose auf Tumorzellen mit erworbener TRAIL-Resistenz und Verlust von Caspase-8 untersucht. Dazu wird die Caspase-8 negative Leukämiezelllinie J-TR (Ehrhardt *et al.*, 2003) sowie die ebenfalls Caspase-8 negative Leukämiezelllinie CEM-TR (Ehrhardt *et al.*, 2003) und die soliden Tumorzelllinien CAD0 und KELLY (Fulda *et al.*, 2001) mit verschiedenen Zytostatika der aktuellen Standardtherapieprotokolle in Kombination mit TRAIL stimuliert und der Einfluss des Zytostatikums auf die TRAIL-induzierte Apoptose untersucht. Es wird überprüft, ob Zytostatika der Standardtherapie in der Lage sind, Zellen mit erworbener oder primärer TRAIL-Resistenz für TRAIL zu sensitivieren bzw. welcher molekulare Mechanismus der verbesserten Apoptoseinduktion durch TRAIL zugrunde liegt.

Bisher wurden nur sehr wenige Untersuchungen mit primären leukämischen Zellen durchgeführt. Für einige Zytostatika sind bei Kombination mit TRAIL sensitivierende Effekte auf primären Zellen nachweisbar (Jones *et al.*, 2003). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung primärer Leukämiezellen auf eine sensitivierende Wirkung der Zytostatika für TRAIL im Hinblick auf die mögliche klinische Anwendung einer Kombinationstherapie.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellkultur

RPMI-Medium mit Glutamin	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
FCS	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Germany)
Hepes Puffer (1M)	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
L-Glutamin	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Trypsin	Biochrom (Berlin, Germany)

2.1.2 Zytostatika und Stimulantien

2.1.2.1 Zytostatika

Asparaginase	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Arabinose C (Ara C) (=Cytosine-beta-D-Arabinofuranosid)	Sigma (Deisenhofen, Germany)
aktiviertes Cyclophosphamid (=4-Hydro-peroxy-cyclophosphamid)	Baxter Oncology GmbH (Frankfurt, Germany)
Dexamethason (H ₂ O löslich)	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Doxorubicin	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Etoposid (VP-16)	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Methotrexat	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
6-Thioguanine	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Vincristin	USPC Inc (Rockeville, MA, USA)

2.1.2.2 Stimulantien und Inhibitoren

TRAIL (Monomer mit His-tag)	exprimiert in P. Pastoris (Jeremias <i>et al.</i> , 1998)
Vektorkontrolle	exprimiert in P. Pastoris
TRAIL (kommerziell)	Pepro Tech. (Rocky Hill, NJ, USA)

(Monomer ohne His-tag)

TRAIL (kommerziell)

Alexis Corp. (Lausanne, Schweiz)

(Trimer mit His-tag)

Actinomycin D

Sigma (Deisenhofen, Germany)

Cycloheximid

Sigma (Deisenhofen, Germany)

zIETD

Calbiochem (San Diego, CA, USA)

2.1.3 TRAIL-Rezeptor Bestimmung

Antikörper gegen TRAIL-R1/2

Alexis Corp. (Lausanne, Schweiz)

2.1.4 Proteinbestimmung

BCA micro kit

Pierce Perbio Science (Bonn, Germany)

BSA

Sigma (Deisenhofen, Germany)

2.1.5 Proteinaseinhibitoren

Aprotinin

Sigma (Deisenhofen, Germany)

DDT

Sigma (Deisenhofen, Germany)

Leupeptin

Sigma (Deisenhofen, Germany)

PMSF

Sigma (Deisenhofen, Germany)

2.1.6 Westernblot

Gel 12%

Biorad (München, Germany)

Rainbowmarker

Amersham (Uppsala, Schweden)

Whatman-Membran

Biorad (München, Germany)

Nitrocellulose-Membran

Amersham (Uppsala, Schweden)

Milchpulver

Merck (Darmstadt, Germany)

Tween 20

Sigma (Deisenhofen, Germany)

Nachweisreagenzien-Kit:

Pierce Super Signal West Femto

Pierce Perbio (Bonn, Germany)

Antikörper:

Anti α -Tubulin	Oncogene (San Diego, CA, USA)
Anti mouse HRP	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti rabbit HRP	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti Caspase-8	Alexis Corp. (Lausanne, Schweiz)
Anti Caspase-10	MBL, (Watertown, MA, USA)
Anti Caspase-3	Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Anti Caspase-9	Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Anti FLIP	Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Anti Bak	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti Bax	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti Bcl-2	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti Bcl-X _L	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti cIAP-1	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti cIAP-2	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA)
Anti XIAP	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Anti Survivin	Sigma (Deisenhofen, Germany)
Anti FADD	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Anti-RIP	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

2.1.7 Puffer

Zytosolischer Lyse-Puffer pro 1 Liter (pH 7.0):

2,76 g	Hepes
74,55 mg	KCl
305 mg	MgCl ₂ x H ₂ O

0,5% Triton X 100

Nicoletti-Puffer pro Liter H₂O :

10 g Triton-X 100

10 g Na-Citrat

PBS 10 x pro 5 Liter (pH 7,3):

400 g NaCl

10 g KCl

72,1 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

2 g KH₂PO₄

Western-Laufpuffer 5 x pro 2,5 Liter:

37,75 g Tris Base

235 g Glycine aqua ad

125 ml SDS

Transferpuffer 1 x pro 1 Liter:

5,8 g Tris Base

1,87 ml SDS 20%

2,93 g Glycine

200 ml Methanol

Lämmli 5 x:

12,5 ml Tris 1M (pH 6,8)

25 ml SDS 20%

25 ml Glycerol 100%

12,5 ml Aqua ad injectionem

2.1.8 Sonstige Materialien

Kollagen-beschichtete Flaschen

BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

Ficoll-Isopaque

Amersham (Uppsala, Schweden)

2.1.9 Geräte

Zentrifuge	Rotana 46R (Hettich Zentrifugen, Germany)
ELISA-Reader	Bio Photometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany)
Western-Blot	Biorad (München, Germany)
FACscan	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Software	Cell Quest (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

2.2.1.1.1 Leukämiezelllinien und adhärente Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Bezeichnung	Beschreibung
JURKAT S J-TR	TRAIL-sensitive Leukämiezelllinie (Ehrhardt <i>et al.</i> , 2003) Caspase-8 negative, derivative JURKAT Zelllinie mit erworbener TRAIL-Resistenz (Ehrhardt <i>et al.</i> , 2003)
CEM S CEM-TR	TRAIL-sensitive Leukämiezelllinie (Ehrhardt <i>et al.</i> , 2003) Caspase-8 negative, derivative CEM Zelllinie mit erworbener TRAIL-Resistenz (Ehrhardt <i>et al.</i> , 2003)
JURKAT A3 JURKAT A3 ohne Caspase-8	TRAIL-sensitive Leukämiezelllinie (Juo <i>et al.</i> , 1998) Caspase-8 negative, derivative Zelllinie (Juo <i>et al.</i> , 1998)
CADO	Caspase-8 negative Ewing-Sarkom-Zelllinie; Caspase-8 Verlust durch Promotor-Hypermethylierung (Fulda <i>et al.</i> , 2001)
KELLY	Caspase-8 negative Neuroblastomzelllinie; Caspase-8 Verlust durch Promotor-Hypermethylierung (Fulda <i>et al.</i> , 2001)

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Die verschiedenen Leukämiezelllinien wurden in RPMI 1640 Medium angereichert mit 10% FCS, 1% Hepes-Puffer und 1% L-Glutamin bei 37° C in exponentiellem Wachstum gehalten.

Die adhärenenten Zelllinien CADO und KELLY wurden in Kollagen-beschichteten Flaschen in oben genanntem RPMI-Medium kultiviert und mit Trypsin zum Splitten der Zellen bzw. zum Aussäen für Stimulationsexperimente gelöst.

2.2.1.1.2 Primäre Patientenzellen

Es wurden Überreste von Knochenmarkspunktaten, die für die Routinediagnostik nicht mehr benötigt worden waren, von 66 Kindern, die zwischen 2001 und 2003 aufgrund einer akuten Leukämie am Dr. von Haunerschen Kinderspital behandelt wurden, anonymisiert und untersucht. Die Proben wurden vor Therapiebeginn bei Erstdiagnose bzw. der Diagnose eines Rezidivs durch Knochenmarkspunktion für die Routinediagnostik gewonnen und die Zellen mit Hilfe der Methode nach Ficoll (Ficoll Isopaque, Amersham, Uppsala, Schweden) isoliert. Die Zellen wurden mit oben beschriebenem RPMI-Medium, das mit 20% FCS angereichert war, aufgenommen und auf eine Dichte von 1 Million Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen sofort gemäss Versuchsprotokoll stimuliert.

2.2.1.2 Stimulationsexperimente

2.2.1.2.1 Leukämiezelllinien und adhärenente Zellen

TRAIL-sensitive, sowie TRAIL-resistente, Caspase-8 negative Leukämiezelllinien wurden in einer Dichte von 250 000 Zellen/ml in 48-Well Platten ausgesät (1ml/Well) und mit den jeweils angegebenen Zytostatika im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Es wurden 9 Zytostatika aus den aktuellen Standardtherapieprotokollen zur Behandlung der akuten Leukämie untersucht (co-ALL Protokoll, BFM Protokoll, AML-Protokoll). Dazu wurden Dosierungen verwendet, die therapeutisch relevante Konzentrationen widerspiegeln und die maximale, während der Therapie im Serum erreichte Konzentration (Peak-Plasma Konzentration) nicht überschreiten. Tabelle 2-2 gibt eine Übersicht über alle getesteten Zytostatika. Angegeben sind sowohl die Peak-Plasma Konzentration, als auch die in den Stimulationsexperimenten für diese Arbeit verwendeten Dosierungen. Diese wurden so gewählt, dass eine spezifische Apoptoserate zwischen 5% und 40% durch das Zytostatikum erreicht wurde (vgl.

Zielkriterien 2.2.2.2.), wobei oftmals Konzentrationen gewählt wurden, die unterhalb des Peak-Plasma Bereichs lagen.

Zytostatikum	Peak-Plasma Spiegel	Literaturangabe	Dosierung im Experiment
Cytarabin	5-20 µM	Estlin <i>et al.</i> , 2001	10-100 nM
6-Thioguanin	0,52-4,1 µM	Lowe <i>et al.</i> , 2001	0,03-3 µM
Doxorubicin	22,6-334 ng/ml	Frosr <i>et al.</i> , 2002	1-30 ng/ml
Methotrexat	5,4-33,7 µM	Evans <i>et al.</i> , 1983	3-100 nM
Vincristin	99-370 ng/ml	Estlin <i>et al.</i> , 2000	3-100 ng/ml
Etoposid	13,1-54,2 µM	Lowis <i>et al.</i> , 1993	0,03-1 µM
Dexamethason	0,65-1,01 µM	Charles <i>et al.</i> , 1993	0,001-1 µM
Cyclophosphamid	0,18-1,1 µM	Hassan <i>et al.</i> , 1999	0,1-1 µM
Asparaginase	1 IU/ml	Appel <i>et al.</i> , 2003	0,3-1 U/ml

Tabelle 2-2: Übersicht über verwendete Zytostatika und ihre Dosierung im Experiment

Nach 24 bzw. 48 Stunden Präinkubationszeit wurde TRAIL in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt. In Vorversuchen konnte bei dieser Dosierung auf den TRAIL-sensitiven Leukämiezelllinien eine relativ konstante TRAIL-induzierte Apoptose zwischen 10% und 20% erzielt werden (vgl. Zielkriterien). In höheren Dosen wirkte TRAIL stark apoptotisch auf diese Zelllinie (Apoptoseraten > 60%), so dass die entsprechenden Versuche nicht in die Auswertung eingeschlossen wurden (vgl. Zielkriterien). Die TRAIL-resistenten Zelllinien wurden mit TRAIL in einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert. Diese Dosierung wird in der Literatur als nicht toxisch beschrieben (Kelley *et al.*, 2001) und könnte somit eine therapeutisch einsetzbare Konzentration *in vivo* widerspiegeln. Sie induzierte in Vorversuchen auf allen untersuchten TRAIL-resistenten Zelllinien auch bei längerer Inkubationszeit

keinen Zelltod. Die Apoptosemessung erfolgte weitere 24 Stunden nach TRAIL-Zugabe mittels FACscan.

Die TRAIL-resistenten, adhärenen Zelllinien CADO und KELLY wurden in einer Dichte von 100 000/ml auf Kollagen beschichteten 6-Well Platten (1ml/Well) ausgesät. Da adhärenente Zellen nach Stimulation mit einem Zytostatikum langsamer sterben, wurde TRAIL erst nach 72-stündiger Präinkubationszeit in einer Konzentration von 1 µg/ml für weitere 24 Stunden hinzugefügt. Die Apoptosemessung erfolgte mittels Färbung nach Nicoletti (2.2.1.1.) im FACscan.

In allen Experimenten wurde ein TRAIL Monomer mit His-tag verwendet, das in der Hefe *P. Pastoris* exprimiert wurde (Jeremias *et al.*, 1998). Kontrollversuche mit kommerziell erwerblichen TRAIL Derivaten (super KILLER-TRAIL, Alexis Corp.: Trimer mit His-tag und TRAIL, Pepro Tech.: Monomer ohne His-tag) führten zu gleichen Ergebnissen (Abbildung 2-1).

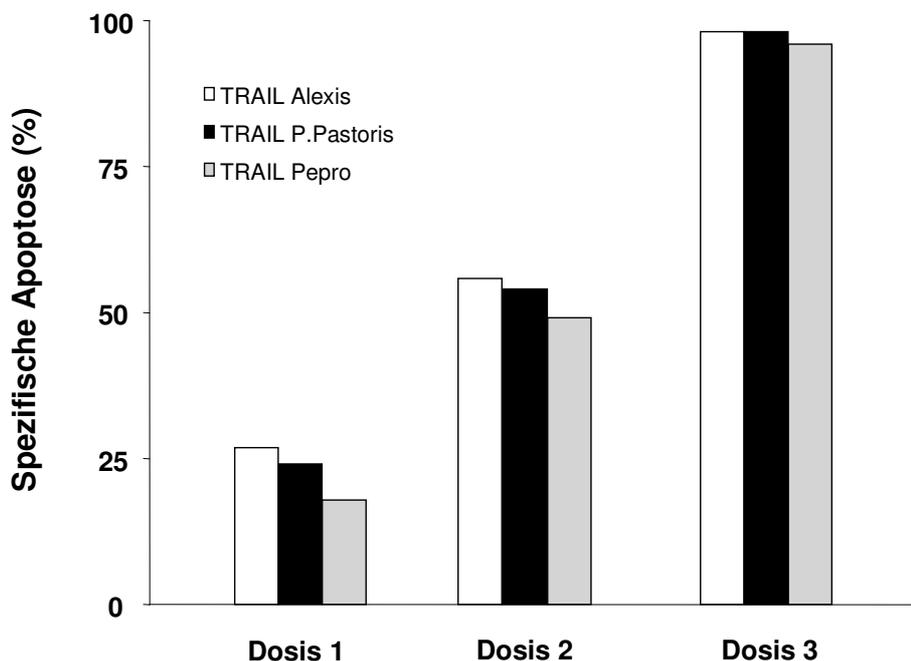


Abbildung 2-1: Vergleich der Wirkung verschiedener TRAIL-Derivate

Parentale JURKAT S (JS) Zellen wurden mit verschiedenen TRAIL Derivaten in jeweils 3 unterschiedlichen Dosen (TRAIL Alexis: 0,001 µg/ml (Dosis 1); 0,003 µg/ml (Dosis 2); 0,3 µg/ml (Dosis 3); TRAIL P. Pastoris: 0,001 µg/ml (Dosis 1); 0,01 µg/ml (Dosis 2); 0,1 µg/ml (Dosis 3); TRAIL Pepro: 0,06 µg/ml (Dosis 1); 0,1 µg/ml (Dosis 2); 1 µg/ml (Dosis 3)) für 24 Stunden inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels FACscan bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 unabhängigen Einzelexperimenten.

2.2.1.2.2 Primäre Patientenzellen

Die Zellen wurden in 96-Well Platten à 1×10^6 Zellen pro ml ausgesät (100µl/Well) und sofort mit Methotrexat (in PBS verdünnt) in verschiedenen Dosen nach Protokoll stimuliert. Da primäre Leukämiezellen *in vitro* sehr rasch absterben, wurden die Zellen nicht zeitversetzt stimuliert, sondern beide Substanzen simultan zugegeben (TRAIL 1 µg/ml). In allen Experimenten an primären Patientenzellen wurde ein TRAIL Monomer ohne His-tag (TRAIL, Pepro Tech.) verwendet. Nach 24 Stunden wurden Kontrollzellen geerntet und die Spontanapoptoserate mittels FACscan bestimmt. Bei einer Apoptoserate von mehr als 40% in den Kontrollzellen wurde die FACs-Analyse bereits nach 24 Stunden durchgeführt, andernfalls erst nach 48h Stunden. In n=17 Proben konnten die Versuche aufgrund des zu geringen Volumens der Probe nicht vollständig durchgeführt und alle im Protokoll angegebenen Dosierungen untersucht werden. Die getesteten MTX-Dosierungen wurden in diesen Proben per Zufallsprinzip ausgewählt.

2.2.1.3 Inhibitionsversuche

Um den Mechanismus des Synergismus herausarbeiten zu können, wurden Reagenzien eingesetzt, welche die Expression von Proteinen der Apoptosesignalkaskade auf verschiedenen Ebenen beeinflussen. So wird durch Zugabe von Cycloheximid die Proteinsynthese (Translation der mRNA) gehemmt oder durch Actinomycin D die Transkription einer Zelle blockiert (Walker *et al.*, 1991), während zIETD selektiv die Aktivierung von Caspase-8 hemmt (Griffith *et al.*, 1998) Zur Durchführung der Inhibitionsversuche mit Cycloheximid und Actinomycin D wurden Caspase-8 negative J-TR Zellen ausgesät und mit Cycloheximid (30, 100, 300 ng/ml) oder Actinomycin D (10, 30 ng/ml) bei 37°C im Brutschrank für 4 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zytostatikum stimuliert wie unter 2.2.1.2.1 beschrieben und für 48 Stunden inkubiert, bevor TRAIL (1 µg/ml) zugegeben wurde. Die Apoptoserate wurde nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit im FACscan gemessen.

Bei den Inhibitionsversuchen mit zIETD wurde die Versuchsdurchführung in folgender Weise abgewandelt: die J-TR Zellen wurden ausgesät, mit dem Zytostatikum stimuliert wie unter 2.2.1.2.1 beschrieben und bei 37°C im Brutschrank präinkubiert. 48 Stunden nach Methotrexatstimulation wurde zIETD (100 µM) 30

Minuten vor der TRAIL-Applikation hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden inkubiert und die Zelltodinduktion im FACscan ermittelt.

2.2.2 Apoptose-Messung

2.2.2.1 Durchflusszytometrie (FACscan)

Stirbt eine Zelle durch Apoptose, nimmt ihr Zellvolumen ab, die Granularität zu und schließlich werden einzelne Zellteile als apoptotische Zellkörperchen abgeschnürt. Tote leukämische Zellen können daher durch Messung der zellulären Größe (kleiner, FCS) und Granularität (höher, SSC) mittels Durchflusszytometrie (FACscan) von intakten Zellen abgegrenzt werden. Dazu wurden jeweils 5000 Zellen gezählt und der Anteil apoptotischer Zellen in zweidimensionaler Darstellung (Fowardside Scatter Analyse) quantifiziert.

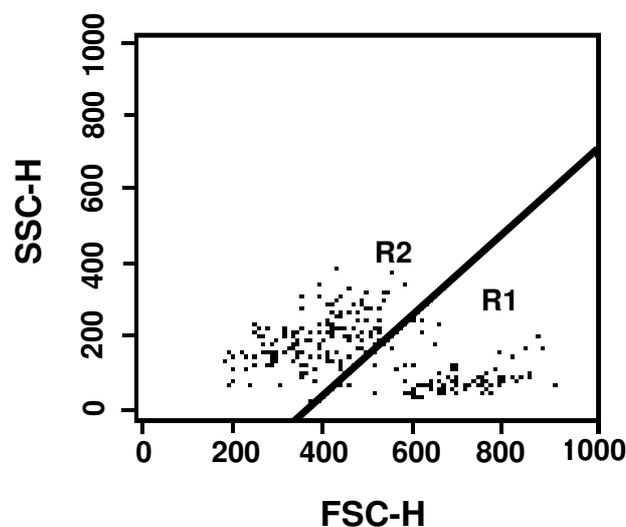


Abbildung 2-2: Messung der Apoptoserate mittels FACscan

Exemplarisch dargestellt ist das Messergebnis einer Leukämiezellprobe mit Quantifizierung der Apoptoserate in zweidimensionaler Darstellung mittels Fowardside Scatter Analyse. R1= lebende Zellen, R2 = apoptotische Zellen

Die Apoptoserate der adhärennten Zelllinien CADO und KELLY wurde mittels Nicoletti-Färbung bestimmt (Nicoletti *et al.*, 1991). Der Nicoletti-Puffer zerstört die Membran einer Zelle, wodurch sich Propidiumjodid an die freiliegende DNA anlagern kann. Im Gegensatz zur gesunden Zelle, bei der die DNA in langen Doppelhelixsträngen vorliegt, zerfällt sie beim Absterben einer Zelle in einzelne Bruchstücke. Dadurch wird

die Fläche kleiner, an die Propidiumjodid anbinden kann. Die DNA apoptotischer Zellen lagert somit weniger Farbe ein und weist bei der FACs-Analyse eine geringere Fluoreszenzintensität auf als die gesunder Zellen.

Zur Durchführung der Nicoletti-Färbung wurden die Zellen pelletiert, im Nicoletti-Lysepuffer bei 4°C für 30 Minuten lysiert und direkt vor der Messung in einer Endkonzentration von 50 µg/ml Propidiumjodid zugegeben. Die Apoptoserate wurde mittels FACs-Messung in Fluoreszenz 3 bestimmt.

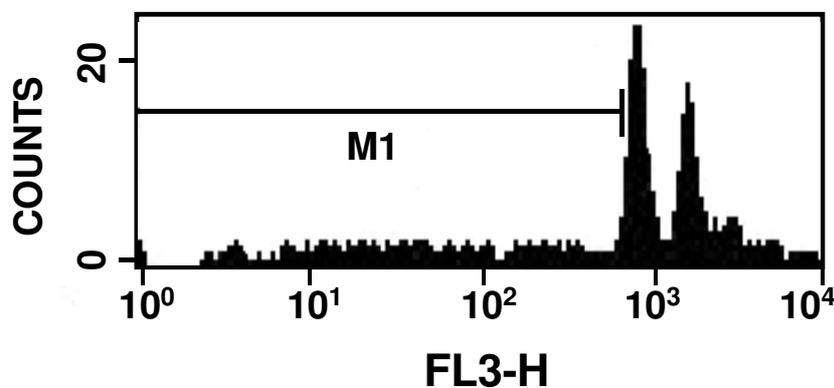


Abbildung 2-3: Messung der Apoptoserate mittels Nicoletti-Färbung im FACscan

Exemplarisch dargestellt ist das Messergebnis der Probe einer adhärenen Zelllinie, welche mittels Nicoletti-Färbung vorbereitet wurde. Gezeigt ist die Messung der Fluoreszenzintensität der Zellen. M1 = apoptotische Zellen

2.2.2.2 Auswertung der FACs-Messungen

Die im FACscan ermittelten Ergebnisse wurden mit Hilfe folgender Formel ausgewertet:

$$\text{Spezifische Apoptose (\%)} = \frac{[(\text{Zytostatikum-induzierte Apoptose} - \text{spontane Apoptose}) \div (100 - \text{spontane Apoptose})] \times 100}{100}$$

Auf diese Weise wurde die Apoptose durch ein Stimulans spezifisch errechnet.

Um optimale Bedingungen für die Erkennung synergistischer Wirkung zu erreichen, wurden folgende Kriterien für die Auswertbarkeit des Einzelexperiments vorgegeben:

1. Spontane Apoptose: < 10%

2. Spezifische Zytostatikum-induzierte Apoptose: 5% - 55%

3. Spezifische TRAIL-induzierte Apoptose auf TRAIL sensitiven Zellen: < 30%

Die optimale Zelltodinduktion durch ein Stimulans alleine wurde so ausgewählt, dass keine zu hohen (>55%) oder zu niedrigen (<5%) Apoptoseraten erreicht wurden, da die hohe Apoptoseinduktion durch eine der angewendeten Substanzen alleine synergistische Effekte maskieren könnte, während eine fehlende oder sehr niedrige Zelltodinduktion möglicherweise durch die fehlende Wirkung des Zytostatikums auf die Zelle bedingt ist.

Versuche, die oben genannte Zielkriterien nicht erfüllten, wurden ausgeschlossen und in der Auswertung nicht berücksichtigt. Aufgrund der Unmöglichkeit einer Versuchswiederholung wurden die oben genannten Zielkriterien für Experimente an Patientenzellen nicht angewendet.

2.2.3 Bestimmung der TRAIL-Rezeptoren

Durch Antikörperfärbung ist es möglich, die Dichte der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen.

Dazu wurden 10^6 Zellen geerntet und mit PBS (1% FCS) zweimal gewaschen. Anschließend wurden 20 μ l des Primärantikörpers (1:10 verdünnt) zugegeben, bei 4°C für 30 Minuten inkubiert und nochmals mit PBS gewaschen. Danach wurden 20 μ l biotinylierte F(ab')₂ Fragmente (Anti-Maus Ig G, 1:20 verdünnt) hinzugefügt, für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und die Zellen anschließend erneut gewaschen. Nach Zugabe von 20 μ l Streptavidin-PE (1:20 verdünnt) wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert und die Rezeptordichte an der Zelloberfläche nach zweimaligem Waschen mit PBS im FACscan in Fluoreszenz 2 ermittelt.

2.2.4 Statistik

Der Grad der sensitivierenden Wirkung eines Zytostatikums für die TRAIL-induzierte Apoptose wurde mit Hilfe der Formel von Webb *et al.* bestimmt (Abbildung 2-4). Dabei wurde der erwartete Effekt bei simultaner Stimulation errechnet als Produkt aus spezifischem Überleben nach Zytostatikum alleine mal spezifischem Überleben nach TRAIL alleine. Das spezifische Überleben wurde berechnet als 1- spezifische Apoptose. Bei sensitivierender Wirkung war das erwartete Überleben grösser als das gemessene Überleben bei simultaner Stimulation. Fractional Product (FP) Werte >

0,1 wurden als relevant angesehen. Negative FP Werte < 0 wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

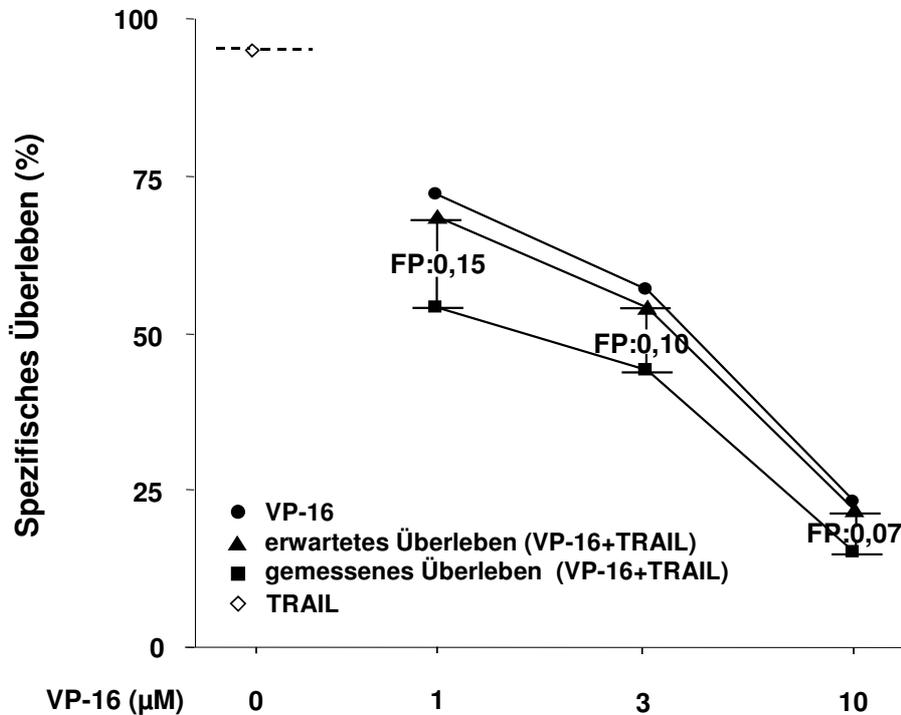


Abbildung 2-4: Fractional Product Methode nach Webb *et al.* zur Bestimmung des Grades der Sensitivierung

Exemplarisch dargestellt ist die sensitivierende Wirkung von Etoposid (VP-16) für die TRAIL-induzierte Apoptose auf einer Probe primärer Leukämiezellen. Das erwartete Überleben nach gemeinsamer Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von VP-16 und TRAIL (1µg/ml; ▲) wurde berechnet als [spezifisches Überleben (TRAIL,◇ unterbrochene Linie) * spezifisches Überleben (VP-16, ●)]. Das Fractional Product (FP) wurde berechnet als [erwartetes Überleben – gemessenes spezifisches Überleben nach Koinkubation mit TRAIL plus VP-16 (■)]. FP Werte >0,1 wurden als relevante Sensitivierung angesehen, wie hier dargestellt bei VP-16 1µM.

Eine Zelllinie wurde dann als „sensitiv“ für TRAIL bezeichnet, wenn die spezifische Apoptoserate nach Stimulation mit 1ng/ml TRAIL 5% oder mehr betrug.

Zum Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede wurde der paired t-test bzw. bei fehlender Normalverteilung der signed rank test für die paarweise Untersuchung verwendet. Für die multivariante Analyse wurde der One way repeated measurements ANOVA bzw. ANOVA on ranks bei nicht-normalverteilten Werten angewendet. Dabei wurden p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant angenommen.

2.2.5 Zellyse

Zur Analyse von zytosolischem Protein wurde ein Lysepuffer verwendet, der selektiv das Zytosol sowie darin enthaltene Zellorganellen lysiert, den Zellkern hingegen intakt lässt.

Dazu wurden Zellen vor und nach Stimulation mit dem Zytostatikum bzw. nach zusätzlicher Stimulation mit TRAIL zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 48h und 72h geerntet und bei 1000 U/min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Zellpellets bei -80°C aufbewahrt. Zur Durchführung der Lyse wurden die Pellets auf Eis aufgetaut. Der Lysepuffer (Puffer Kern A) wurde mit den erforderlichen Proteinaseinhibitoren Aprotinin (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 4°C), DDT (1 mM bei -20°C), Leupeptin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei -20°C) und PMSF (1 mM 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei -20°C , Stock 100 mM in Ethanol) (jeweils 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Puffer bzw. 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Puffer DDT) versetzt, in 10-facher Menge zugegeben und die Zellpellets bei 4°C unter wiederholtem Vortexen für 20 Minuten lysiert. Anschliessend wurden die Zellen bei 1000 U/min (5 Minuten bei 4°C) abzentrifugiert. Der dem Zytosol-Lysat entsprechende Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt (2.2.6)

2.2.6 Proteinbestimmung

Um Zellysate mit vergleichbarem Proteingehalt zu untersuchen, wurde die Proteinmenge für jede Probe einzeln ermittelt. Die Proteinbestimmung wurde mit dem *BCA mikro kit von Pierce durchgeführt. Zur Erstellung der Eichkurve wurden BSA-Verdünnungen als Standard verwendet, die eine definierte Proteinmenge zwischen 0,125 mg/ml und 4 mg/ml enthalten. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei 650nm photometrisch bestimmt. Dabei entspricht die Stärke der Blaufärbung der in der Probe enthaltenen Proteinmenge. Anschließend wurde jede Probe mit PBS auf 1 μg Protein/ μl eingestellt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots wird nach Lyse der Zelle die zytosolische Expression einzelner Proteine der Apoptosesignalkaskade bestimmt. Somit ist es möglich, die Zellen nach Stimulation auf Veränderungen in ihrer Proteinexpression zu untersuchen und mit der Proteinexpression unbehandelter Zellen zu vergleichen.

Zunächst wurden die Proteinlysate in einem Polyacrylamid-Gel biphasisch elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden die Zelllysate bei 4°C aufgetaut und im Verhältnis 1:2 mit Lämmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Danach wurde jeweils 10 µg/µl Protein pro Bahn auf das Gel aufgetragen und die erste Bahn mit 1 µl Rainbow-Marker als Standard beladen. Dieser Marker wird ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt, wobei definierte Standardproteingrößen farblich unterschieden werden können und als Standard zur Bestimmung der Proteingröße der zu untersuchenden Proben dienen. Um eine veränderte Proteinexpression nach Stimulation im Western Blot besser untersuchen zu können, wurden die weiterführenden Experimente nach primär positivem Experiment mit 50 µg/µl Protein pro Bahn durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach 30-minütiger Einlaufzeit (60V) im Sammelgel (4%) bei einer konstanten Spannung von 160V im Trenngel (12%). Die Gelkammer wurde von Außen mit Eis gekühlt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer Blotting-Apparatur im halbtrockenen Verfahren für 75 Minuten bei 20V auf Nitrozellulose als Sekundär-Träger transferiert und die Standardbanden des Rainbow-Markers nach dem Transfer auf der Membran markiert. Die Nitrozellulose-Membranen wurden für 30 Minuten mit PBS-Tween + Milchpulver (5%) überschichtet, um die unspezifischen Bindungen der Antikörper zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween für je 10 Minuten wurden die Membranen mit einem Primärantikörper (1: 25 – 1: 5000 in PBS-Tween verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach wiederum 3x10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für mindestens 1 Stunde mit einem HRP (horseradish-peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörper (1: 5000 in PBS-Tween verdünnt) inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 1 Minute lang mit dem Nachweisreagens (ECL) überschichtet. Hierbei wurden 10 ml Reagenz I, 50 µl Reagenz II und 22 µl Reagenz III, sowie direkt vor der Inkubation 3 µl H₂O₂ zugefügt. Nach Abtrocknen der Membran wurde die Chemolumineszenz-Reaktion in der Photokammer für Inkubationszeiten zwischen 5 Sekunden und 15 Minuten auf Röntgenfilm festgehalten. Die Expressionsstärke des untersuchten Proteins wurde anhand der Bandendicke ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Leukämiezelllinien auf Auftreten und Häufigkeit einer Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch konventionelle Zytostatika

Um die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika in Kombination mit TRAIL zu untersuchen, wurde die TRAIL-resistente Zelllinie J-TR (Ehrhardt *et al.*, 2003) und ihre parentale, TRAIL-sensitive Ausgangszelllinie JURKAT S (JS) verwendet (Abbildung 3-1).

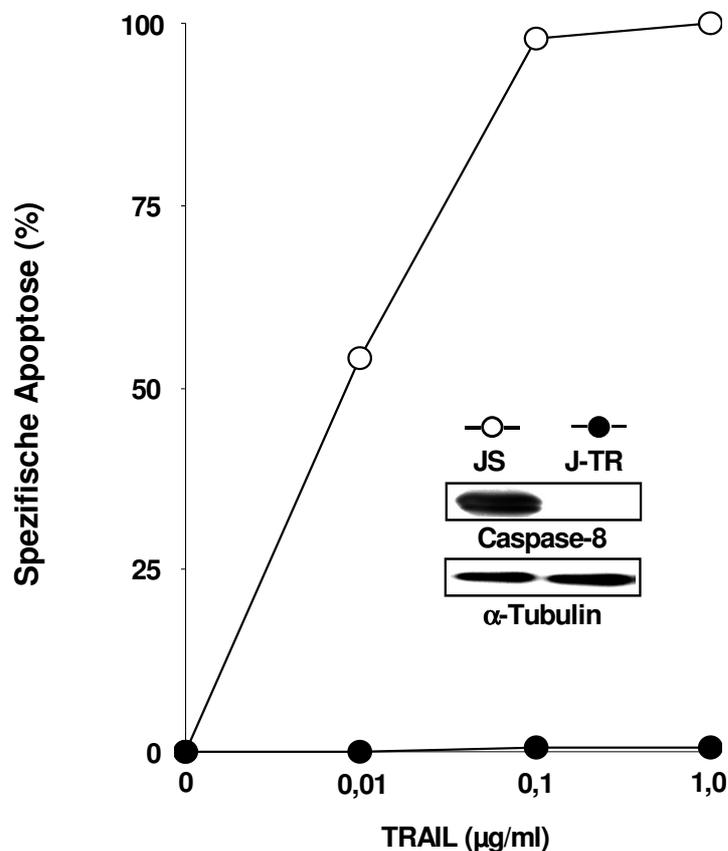


Abbildung 3-1: TRAIL-induzierte Apoptose auf Caspase-8 positiven und Caspase-8 negativen JURKAT Zellen

Parentale JURKAT S (JS) Zellen und derivative JURKAT TR (J-TR) Zellen wurden für 12 Stunden mit TRAIL in angegebener Konzentration inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels FACscan gemessen. Zelluläres Protein unstimulierter Zellen wurde entnommen und die Western Blot Analyse mit α -Tubulin als Kontrolle der geladenen Proteinmenge durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Einzelexperiment aus drei voneinander unabhängigen Experimenten

Zunächst wurden 9 Zytostatika aus den aktuellen Standardtherapieprotokollen (co-ALL Protokoll, BMF Protokoll, AML-Protokoll, vgl. Tabelle 2-2, 2.2.1.2.1) in Kombination mit TRAIL auf den Caspase-8 negativen, TRAIL-resistenten J-TR Zellen

auf Auftreten und Häufigkeit einer Sensitivierung getestet. Da die Stimulation menschlicher Hepatozyten mit Polyhistidin-gekoppeltem, rekombinantem TRAIL *in vitro* zum Absterben von über 60% der Zellen führte (Jo *et al.*, 2000) und somit Hepatotoxizität bei Anwendung eines His-tagged TRAIL-Derivates *in vivo* nicht ausgeschlossen werden kann (vgl. 1.3), wurde in allen Versuchen ein ungekoppeltes TRAIL-Monomer verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3-2 A dargestellt.

Vergleicht man in der Abbildung die spezifische Apoptose nach Stimulation mit einem Zytostatikum alleine (weiße Balken) mit der spezifischen Zelltodinduktion nach kombinierter Stimulation mit TRAIL (schwarze Balken), so zeigt sich bei kompletter TRAIL-Resistenz ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate für Cytarabin (12% auf 18%), 6-Thioguanin (17% auf 30%), Vincristin (10% auf 21%) und Methotrexat (20% auf 36%) (*p < 0,05). Für alle übrigen getesteten Zytostatika (Dexamethason, Cyclophosphamid, Asparaginase, Doxorubicin, Etoposid) wurde kein oder nur ein geringer Anstieg der Apoptoserate bei kombinierter Stimulation nachgewiesen.

Um die erzielten Ergebnisse bezüglich erwarteter und gemessener Wirkung zu vergleichen und die Ausprägung der Sensitivierung zu bestimmen, wurde der FP Wert für jedes Zytostatikum berechnet (vgl. 2.2.4). Ein relevanter FP Wert grösser 0,1 wurde für Methotrexat (0,17) und Vincristin (0,11) errechnet.

Parallel zu den Versuchen auf der TRAIL-resistenten Zelllinie J-TR wurde die parentale TRAIL sensitive Zelllinie JS untersucht und die Ergebnisse dieser Experimente mit denen der J-TR Zelllinie verglichen. Im Gegensatz zu den Experimenten an J-TR Zellen wurden dabei geringere TRAIL-Konzentrationen und zum Teil auch geringere Zytostatikadosierungen verwendet. Abbildung 3-2 B zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

Bei einer TRAIL-induzierten spezifischen Apoptose von 11% wurde die Apoptoserate bei simultaner Applikation von TRAIL und Dexamethason, Cytarabin sowie Asparaginase über den erwarteten Wert bei Addition der Werte bei jeweils getrennter Stimulation gesteigert. Nach Berechnung des Grades der Sensitivierung mittels der Fractional Product Methode zeigte sich für keines der getesteten Zytostatika eine relevante Ausprägung (FP ≤ 0,1). Lediglich bei kombinierter Stimulation von Dexamethason und TRAIL wurde eine signifikante Erhöhung der Apoptose bei kombinierter Stimulation (*p<0,05) mit einem FP Wert von 0,1 erreicht. Im Vergleich zu oben beschriebenen Experimenten an den TRAIL resistenten J-TR Zellen führte

die Kombination von Methotrexat und TRAIL auf der Zelllinie JS nicht zu einer relevanten Sensitivierung.

Da für Methotrexat auf TRAIL resistenten J-TR Zellen der Nachweis einer ausgeprägten Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose gelang, wurde die Wirkung dieses Zytostatikums auf J-TR Zellen im Folgenden genauer untersucht.

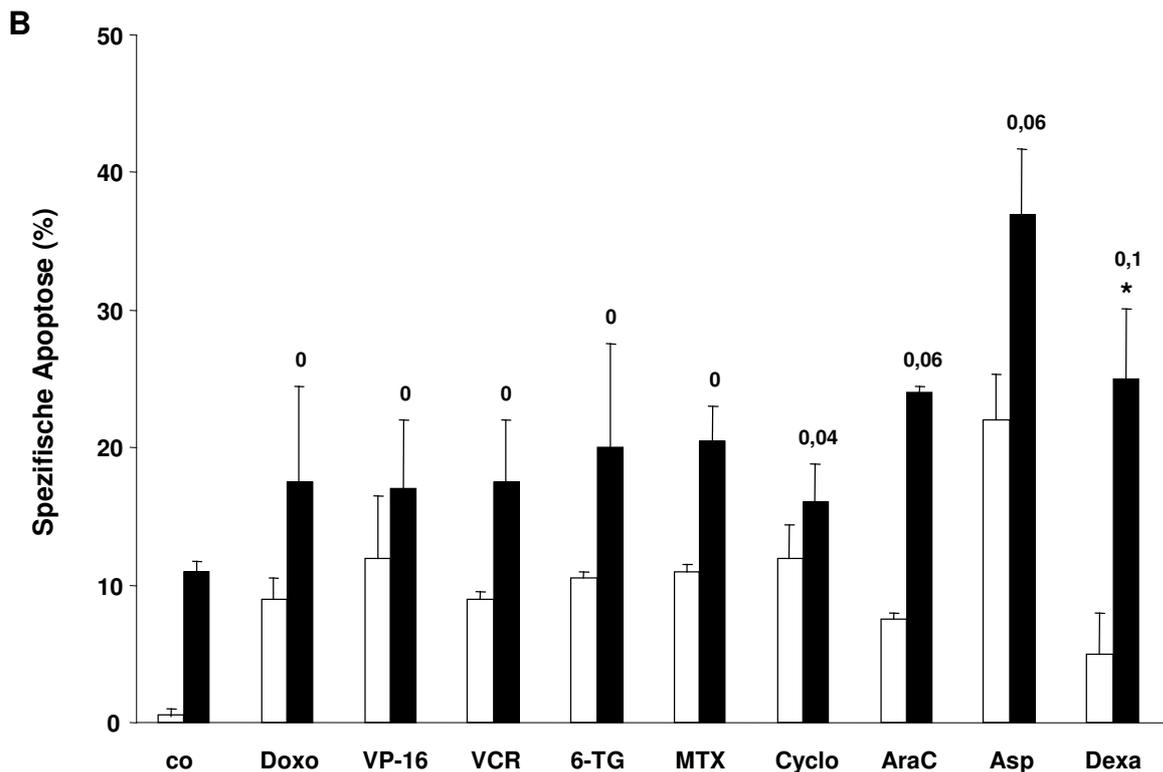
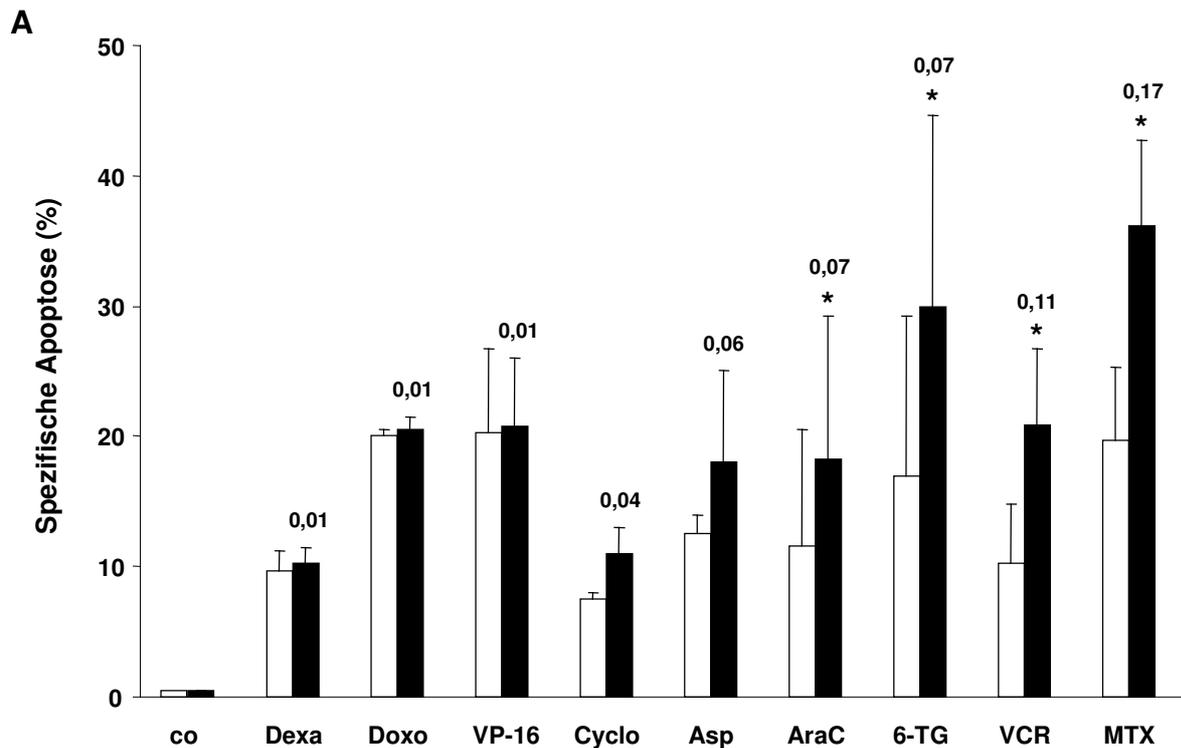


Abbildung 3-2 A und B: Sensitivierung von Zytostatika der Standardtherapie für TRAIL-induzierte Apoptose auf J-TR und JS Zellen

J-TR Zellen (A) und parentale JS Zellen (B) wurden für 48 Stunden mit Cytarabin (AraC, 30 nM (A) bzw. 50 nM (B)), 6-Thioguanin (6-TG, 1 μ M (A) bzw. 0,3 μ M (B)), Doxorubicin (Doxo, 30 ng/ml (A) bzw. 6 ng/ml (B)), Methotrexat (MTX, 10 nM (A und B)), Vincristin (VCR, 30 ng/ml (A) bzw. 0,6 ng/ml (B)), Etoposid (VP-16, 0,3 μ M (A) bzw. 0,06 μ g/ml (B)), Dexamethason (Dexta, 10^{-6} M (A und B)), Cyclophosphamid (Cyclo, 0,6 μ M (A) bzw. 0,3 μ M (B)) oder Asparaginase (Asp, 1 U/ml (A) bzw. 0,6 U/ml (B)) präinkubiert und anschliessend für weitere 24 Stunden mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) TRAIL (1 μ g/ml (A) bzw. 10 ng/ml (B)) inkubiert. Die Apoptose wurde mittels FACscan bestimmt. co = Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens 3 Einzelexperimenten \pm SEM. * $p < 0,05$ RM ANOVA on ranks

3.2 Untersuchung der sensitivierenden Wirkung von Methotrexat auf die Apoptoseinduktion durch TRAIL

3.2.1 TRAIL-resistente JURKAT Zellen

Um den sensitivierenden Effekt auf J-TR Zellen weiter zu charakterisieren, wurde zunächst die Abhängigkeit der Sensitivierung für TRAIL von der Konzentration des Zytostatikums untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3-3 A dargestellt.

Es zeigte sich das konstante Vorhandensein eines sensitivierenden Effektes bei Zytostatikumkonzentrationen zwischen 6 und 30 nM mit signifikanter Erhöhung der Apoptoserate bei kombinierter Stimulation mit Methotrexat und TRAIL (*p < 0,05). Die Berechnung des FP Wertes zur genaueren Bestimmung des Grades der Sensitivierung liess eine Zunahme der Ausprägung mit steigender Methotrexatdosis erkennen. Für Dosen > 6 nM (10 und 30 nM) wurden mit 0,15 (10 nM) bzw. 0,18 (30 nM) relevante FP Werte > 0,1 errechnet. Um vergleichbare, stabile Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde in allen weiteren Versuchen mit einer Methotrexatkonzentration von 10 nM gearbeitet, da die durch diese Konzentration erreichten Apoptoseraten die Zielkriterien (vgl. 2.2.2.2) erfüllten und konstant zu sensitivierenden Effekten bei kombinierter Applikation mit TRAIL führten.

In einem nächsten Schritt wurde genauer untersucht, wie sich Auftreten und Ausprägung der sensitivierenden Wirkung von Methotrexat für TRAIL in Abhängigkeit von der Gesamtinkubationszeit verhielten (Abbildung 3-3 B).

Vergleicht man in der Abbildung die spezifische Apoptose nach Stimulation mit Methotrexat alleine (weiße Balken) mit der Zelltodinduktion durch kombinierte Stimulation mit TRAIL (schwarze Balken) unter Berücksichtigung der angegebenen Inkubationszeiten, so erkennt man eine Verstärkung des sensitivierenden Effekts mit der Länge der Gesamtinkubationszeit.

Eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate bei kombinierter Stimulation im Vergleich zur Applikation der jeweiligen Substanz alleine war für Gesamtinkubationszeiten > 24 Stunden (48, 72, 96 Stunden) nachweisbar (*p < 0,05).

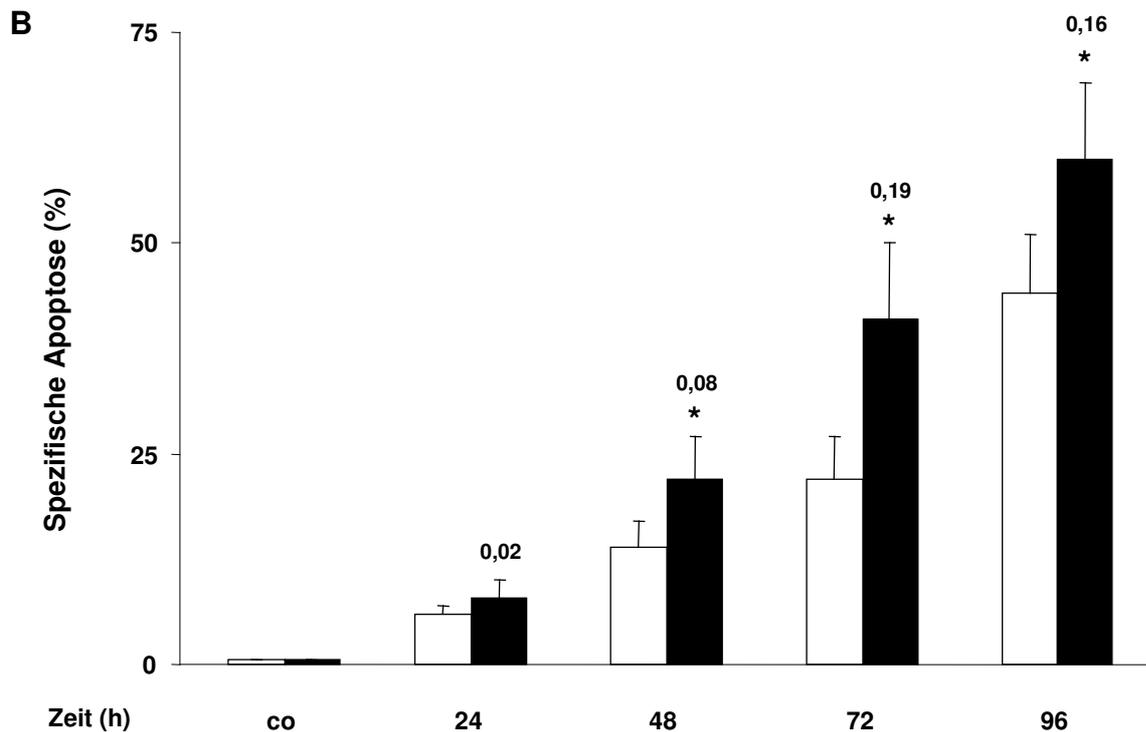
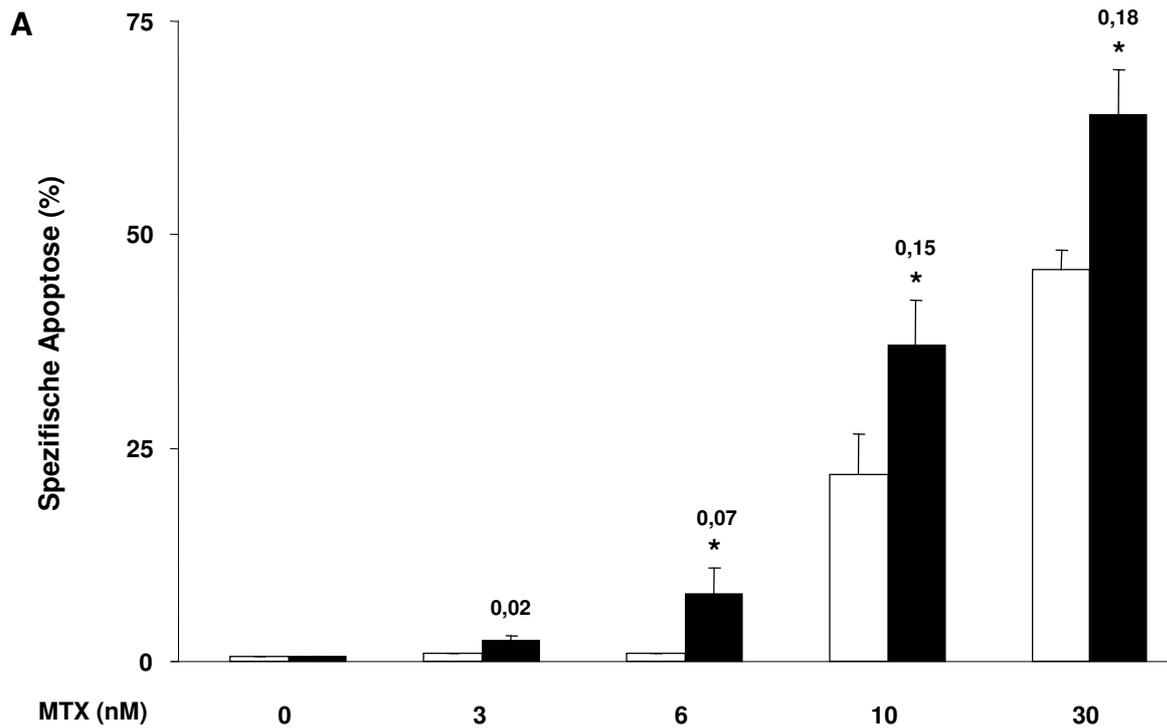


Abbildung 3-3 A und B: Sensitivierende Wirkung von MTX für TRAIL-induzierte Apoptose auf J-TR Zellen in Abhängigkeit von der MTX-Konzentration und der Inkubationszeit mit MTX

J-TR Zellen wurden für 48 Stunden mit Methotrexat (MTX 3, 6, 10, 30 nM) präinkubiert und anschliessend für weitere 24 Stunden mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) TRAIL (1 µg/ml) inkubiert (A). J-TR wurden mit Methotrexat (MTX 10 nM) inkubiert, mit TRAIL stimuliert wie beschrieben. Angegeben ist die jeweilige Gesamtinkubationszeit (B). Die Apoptoserate wurde mittels FACscan gemessen. Der errechnete Fractional Product Wert für jede Konzentration ist über dem schwarzen Balken angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Einzelerperimenten ± SEM. * $p < 0,05$ RM ANOVA on ranks

Die Berechnung des FP Wertes zeigte, dass die Sensitivierung nach 72-stündiger Inkubationszeit am stärksten ausgeprägt war (FP: 0,19), während durch eine weitere Verlängerung der Gesamtinkubationszeit auf 96 Stunden keine weitere Steigerung der Ausprägung erreicht wurde (FP: 0,16). Für alle folgenden Versuche wurde daher, wenn nicht anders angegeben, eine Inkubationszeit von 72 Stunden festgelegt.

3.2.2 Ausweitung der Versuche auf andere Leukämiezelllinien und adhärente Zellen mit Verlust von Caspase-8 Protein

In vorangehenden Versuchen wurde gezeigt, dass die kombinierte Stimulation der TRAIL-resistenten Leukämiezelllinie J-TR mit Methotrexat und TRAIL zu einer relevanten Wirkungsverstärkung führt, welche sich auf der Caspase-8 exprimierenden, parentalen Zelllinie JS nicht nachweisen liess. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Sensitivierung für TRAIL durch dieses Zytostatikum auch bei verschiedenen anderen Caspase-8 negativen Zelllinien auftritt. Dazu wurden zwei weitere TRAIL-resistente Leukämiezelllinien (JA3 ohne Caspase-8 und CEM-TR) sowie die ebenfalls Caspase-8 negativen, TRAIL-resistenten adhärennten Zelllinien CADO und KELLY auf das Vorhandensein einer Sensitivierung durch Methotrexat untersucht. Während JA3 Caspase-8 primär verloren haben (Juo *et al.*, 1998), ist der Caspase-8 Verlust bei CEM-TR sekundär durch Inkubation mit TRAIL erworben (Ehrhardt *et al.*, 2003).

Da bisher ausschließlich Leukämiezelllinien auf sensitivierende Effekte durch Methotrexat untersucht wurden, wurden zusätzlich solide Zelllinien mit Verlust von Caspase-8 Protein in die Versuchsreihe eingeschlossen. Hierzu wurden die TRAIL-resistente Ewing-Sarkom-Zelllinie CADO sowie die ebenfalls TRAIL-resistente Neuroblastomzelllinie KELLY untersucht, deren Caspase-8 Verlust durch Promotor-Hypermethylierung bedingt ist (Fulda *et al.*, 2001). Abbildung 3-4 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.

Durch kombinierte Stimulation von Methotrexat und TRAIL wurde die Apoptoserate auf den beiden Leukämiezelllinien CEM-TR und JA3 ohne Caspase-8 sowie der adhärennten Zelllinie CADO im Vergleich zum erwarteten Wert signifikant gesteigert (* $p < 0,05$). Auch auf der adhärennten Zelllinie KELLY wurde eine, wenn auch weniger ausgeprägte, Steigerung der spezifischen Apoptose bei kombinierter Applikation von TRAIL und dem Zytostatikum erreicht. Die Berechnung des Grades der Sensitivierung auf diesen Zelllinien mittels der Fractional Product Methode ergab eine

relevante Ausprägung auf den getesteten Leukämiezelllinien CEM-TR (FP: 0,16) und JA3 ohne Caspase-8 (FP: 0,12). Der sensitivierende Effekt von Methotrexat für die kombinierte Stimulation mit TRAIL war, verglichen mit den leukämischen Zellen, auf den beiden untersuchten adhärenenten Zelllinien weniger stark ausgeprägt (FP: 0,08 (CADO) bzw. FP: 0,05 (Kelly)).

In Anlehnung an oben beschriebene parallele Untersuchung der parentalen Zelllinie JS wurden zusätzlich identische Versuche an den parentalen, Caspase-8 exprimierenden Zelllinien CEM und J-A3 durchgeführt. In Übereinstimmung mit den bisher erhobenen Ergebnissen am Zellmodell J-TR/JS (vgl. 3.1) wurden auch auf diesen TRAIL-sensitiven, Caspase-8 exprimierenden Zelllinien keine synergistischen Effekte für Methotrexat und TRAIL nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

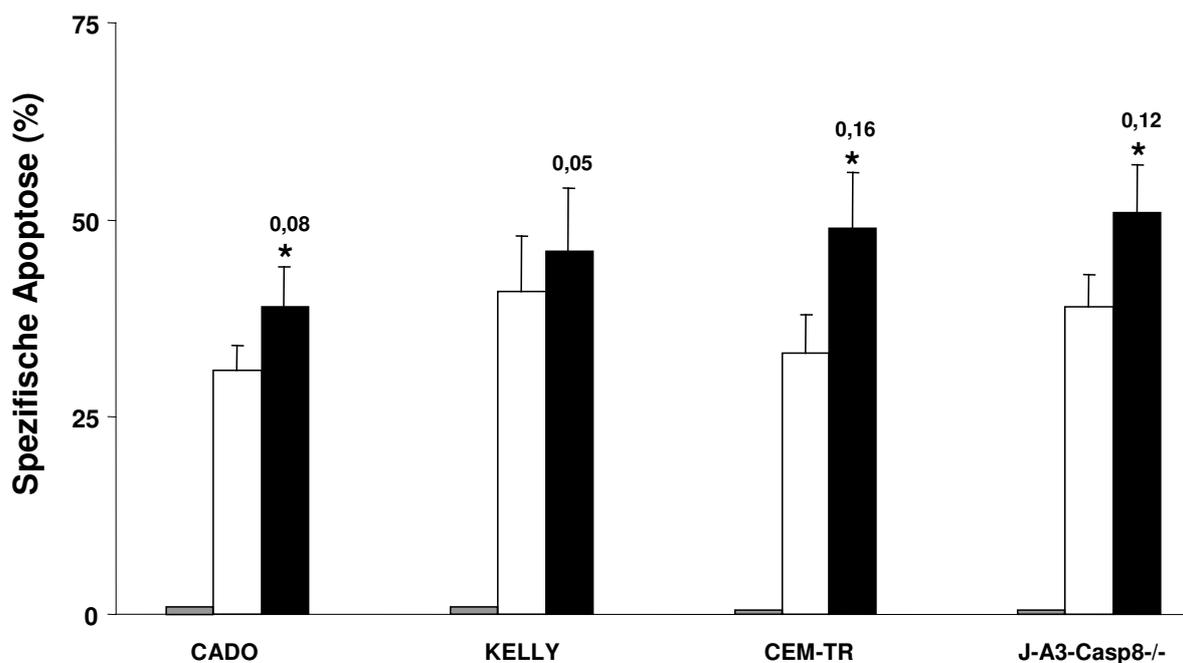


Abbildung 3-4: Sensitivierende Wirkung von MTX für TRAIL-induzierte Apoptose auf weiteren Zelllinien

CADO und KELLY Zellen sowie J-A3-Casp-8-/-und CEM-TR Zellen wurden für 72 Stunden (CADO/KELLY) bzw. für 48 Stunden (J-A3-Casp-8-/-/CEM-TR) mit TRAIL alleine (graue Balken) bzw. Methotrexat inkubiert und anschliessend für weitere 24 Stunden mit (schwarze Balken) bzw. ohne TRAIL (1µg/ml) (weiße Balken) inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels FACscan bestimmt. Der errechnete Fractional Product Wert ist über dem schwarzen Balken angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Einzelexperimenten ± SEM. * $p < 0,05$ RM ANOVA on ranks

3.2.3 Untersuchung primärer kindlicher Leukämiezellen auf eine Sensitivierung durch Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose

Bisher erfolgten Untersuchungen der sensitivierenden Wirkung von Methotrexat für TRAIL ausschließlich auf Zelllinien *in vitro*. Um die Bedeutung dieses Phänomens für primäre Tumorzellen besser abschätzen zu können, wurden zusätzlich primäre Patientenzellen mit Methotrexat und TRAIL *in vitro* stimuliert und die Ergebnisse mit den entsprechenden klinischen Daten korreliert.

Dazu wurden Knochenmarkspunktate von 66 Kindern untersucht, die an akuter Leukämie erkrankt waren. Ähnlich den Experimenten am Zellmodell wurde die Zelltodinduktion durch jede Substanz alleine verglichen mit der Zelltodinduktion nach gemeinsamer Stimulation und die Ausprägung der Sensitivierung von Methotrexat für TRAIL wie bei den vorhergehenden Experimenten mittels der Fractional Product Methode nach Webb *et al.* errechnet. Abbildung 3-5 gibt einen Überblick über Auftreten und Häufigkeit relevanter sensitivierender Effekte nach kombinierter Stimulation mit Methotrexat und TRAIL auf primären Leukämiezellen. Dargestellt sind alle Proben mit FP Werten > 0 , in denen nach kombinierter Stimulation eine höhere Zelltodinduktion auftrat als es die Zelltodinduktion durch jede Substanz alleine erwarten lässt ($n=47$). In 19 der 66 Proben wurde die Apoptose durch simultane Applikation von Methotrexat und TRAIL nicht gesteigert ($FP \leq 0$).

Um die Ausprägung der Sensitivierung beurteilen zu können, wurde ein cut off des FP von 0,1 verwendet. Es zeigten sich bei 18 der insgesamt 66 getesteten Patientenproben (27 %) relevante sensitivierende Effekte. Da die Sensitivierung durch Methotrexat für die TRAIL-induzierte Apoptose in oben beschriebenen Experimenten ausschliesslich auf TRAIL-resistenten Zelllinien nachweisbar war, wurden alle Patientenproben bezüglich TRAIL-Sensitivität (spezifische Apoptose $\geq 5\%$, weisse Balken) bzw. TRAIL-Resistenz (spezifische Apoptose $< 5\%$, schwarze Balken) aufgetrennt und auf Häufigkeit und Ausprägung der Sensitivierung untersucht. Insgesamt waren 11 der 47 Patientenproben TRAIL-sensitiv, 36 Proben hingegen TRAIL-resistent. Bei 18 (38 %) der 47 abgebildeten Patientenproben wurde die Apoptoserate durch kombinierte Stimulation relevant erhöht. Unter diesen Proben befanden sich 14 Patientenproben (78 %) mit TRAIL-Resistenz. Somit kam es auf 14 von 36 Patientenproben mit TRAIL-Resistenz (39 %) zu relevanten sensitivierenden Effekten durch Methotrexat für die TRAIL-induzierte Apoptose. Zusätzlich wurden auf TRAIL-resistenten Patientenproben ($FP: 0,12 < x < 0,82$), im Vergleich zu den

sensitiven Proben (FP: $0,11 < x < 0,16$), stärker ausgeprägte Effekte nachgewiesen. Insgesamt liess sich für den Vergleich der relevanten sensitivierenden Effekte bei TRAIL-Resistenz gegenüber TRAIL-Sensitivität ein beinahe signifikanter Unterschied ($p = 0,054$) nachweisen.

In Tabelle 3-1 wurden die FP Werte der oben beschriebenen Experimente mit klinischen Daten der Patienten bezüglich Alter, Geschlecht, Leukämietyp, Erstdiagnose bzw. Rezidiv, sowie Risikostratifizierung korreliert und auf statistische Unterschiede getestet. Der Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschiedes ($*p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurde nicht erbracht, jedoch zeigte sich eine Tendenz zur seltenen Sensitivierung in den prognostisch ungünstigen Situationen Alter < 2 Jahre und T-Zell Leukämie.

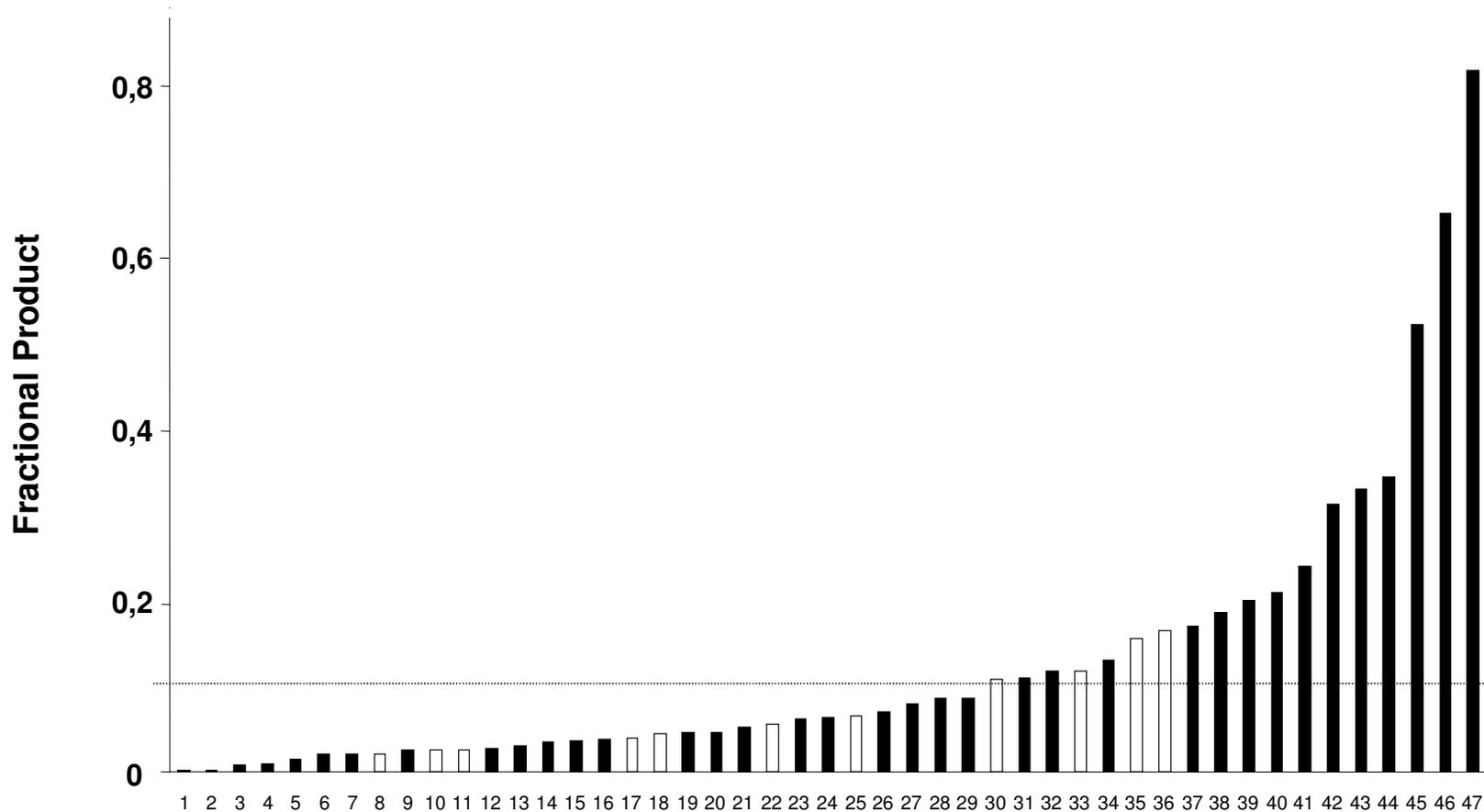


Abbildung 3-5: Sensitivierende Wirkung von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose auf primären Leukämiezellen

Primäre Leukämiezellen von 66 Kindern mit akuter Leukämie wurden mit Methotrexat (3, 10, 30 nM) und TRAIL (10 ng/ml) für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Das Fractional Product (FP) wurde für jede Methotrexatkonzentration berechnet wie in 3.2.4 beschrieben. Die Apoptoserate wurde mittels FACscan bestimmt. Dargestellt ist jeweils die maximale Sensitivierung, die bei einer der getesteten Konzentrationen aufgetrat. FP-Werte >0,1 wurden als relevante Sensitivierung angesehen (gepunktete Linie). Gezeigt werden alle Proben (n = 47) mit FP Werten > 0.

Schwarze Balken= TRAIL-Resistenz (spezifisches Apoptose durch TRAIL < 5%), weiße Balken= TRAIL-Sensitivität (spezifische Apoptose durch TRAIL ≥ 5%).

	Anzahl der Patienten	Fractional Product		median Fractional Product (%)	p - Wert
		Anzahl der Proben mit Fractional Product < 0,1	Anzahl der Proben mit Fractional Product ≥ 0,1		
Alter (Jahre)					
< 2	6	6	0	0,0135	(p=0,113)
2 – 9	47	30	17	0,0525	
≥ 10	13	12	1	0,021	
Geschlecht					
weiblich	36	27	9	0,0289	(p=0,523)
männlich	30	21	9	0,0376	
Stadium					
Diagnose	54	38	16	0,0383	(p=0,382)
Rezidiv	12	10	2	0,0206	
Leukämie					
c-ALL	35	23	12	0,0459	(p=0,283)
B-cell-ALL	14	13	1	0,0135	
T-cell-ALL	7	6	1	0,0079	
AML	10	6	4	0,0356	
Risikostratifizierung für ALL bei Erstdiagnose (n=28)					
standard risk	22	17	5	0,0407	(p=0,605)
high risk	25	17	8	0,0392	
TRAIL-Sensitivität (spezifische Apoptose durch TRAIL)					
TS (≥ 5%)	21	17	4	0,0210	(p=0,054)
TR (< 5%)	45	31	14	0,0453	

ALL = akute lymphatische Leukämie
 AML = akute myeloische Leukämie
 c = common
 standard risk = low and medium risk

Tabelle 3-1: Korrelation klinischer Daten zur Sensitivierung durch Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose auf primären Leukämiezellen *in vitro*

3.3 Inhibition der Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch Methotrexat

Im Folgenden wurde untersucht, über welchen intrazellulären Mechanismus Methotrexat in der Lage ist, TRAIL-resistente Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren.

Dazu wurde die Protein-Neosynthese der Zellen chemisch auf verschiedenen Stufen gehemmt. Die Caspase-8 negativen J-TR Zellen wurden mit Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Proteinsynthese, oder Actinomycin D (ActD), einem Hemmstoff der Transkription, vorbehandelt und anschliessend wie in den vorhergehenden Versuchen mit Methotrexat und TRAIL stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-6 A (ActD) und B (CHX) dargestellt.

Die Präinkubation mit Actinomycin D führte zu einer signifikanten Abschwächung der Sensitivierung durch Methotrexat (Spezifische Apoptose 43%) im Vergleich zur Stimulation ohne den Proteinsyntheseinhibitor (Spezifische Apoptose 55%). Die Berechnung des FP Wertes zeigte zudem eine geringere Ausprägung des Effektes in Anwesenheit von Actinomycin D (FP: 0,09) verglichen mit der kombinierten Stimulation ohne Actinomycin D (FP: 0,18). Bei Präinkubation mit Cycloheximid war ein ähnlicher Effekt nachweisbar. Der FP Wert von 0,13 bei alleiniger Stimulation mit Methotrexat und TRAIL verringerte sich signifikant auf 0,06 bei Stimulation mit Methotrexat, TRAIL und Cycloheximid. Dies entspricht einer Verminderung der Apoptoserate von 31% auf 20%.

Durch Applikation von Inhibitoren der Protein-Neosynthese wurde der sensitivierende Effekt von Methotrexat in oben beschriebenen Versuchen signifikant abgeschwächt. Es ist daher denkbar, dass die Synthese intrazellulärer Proteine im verwendeten Zellmodell massgeblich an der Regulation der Apoptose-Sensitivität beteiligt ist.

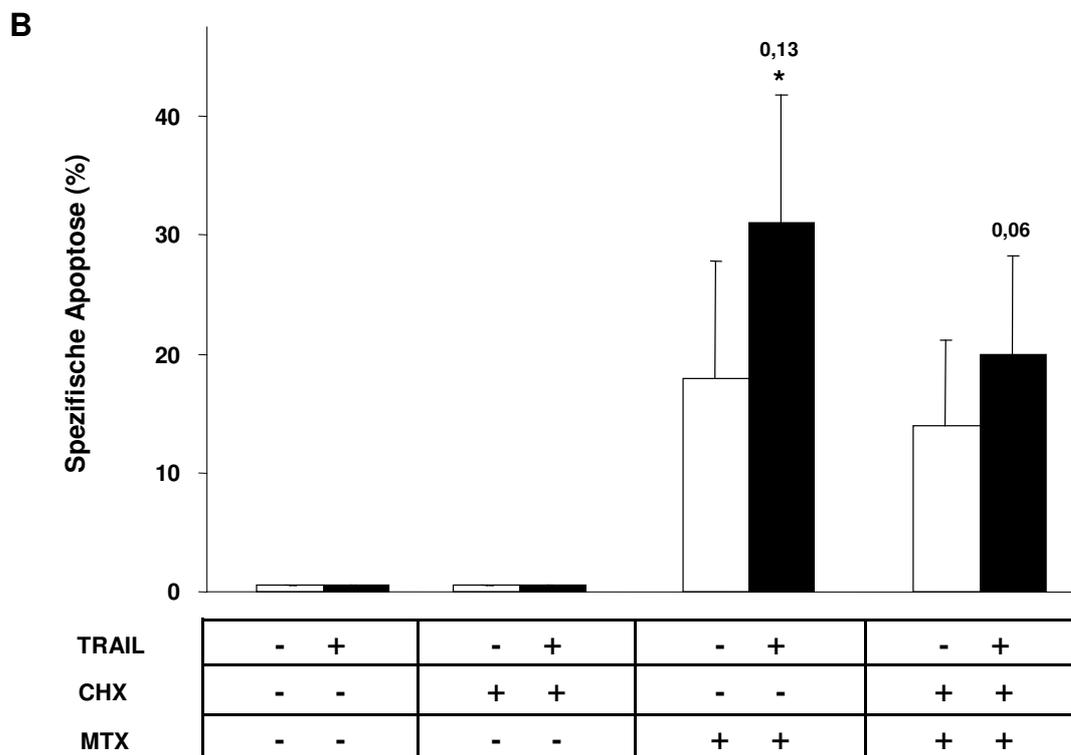
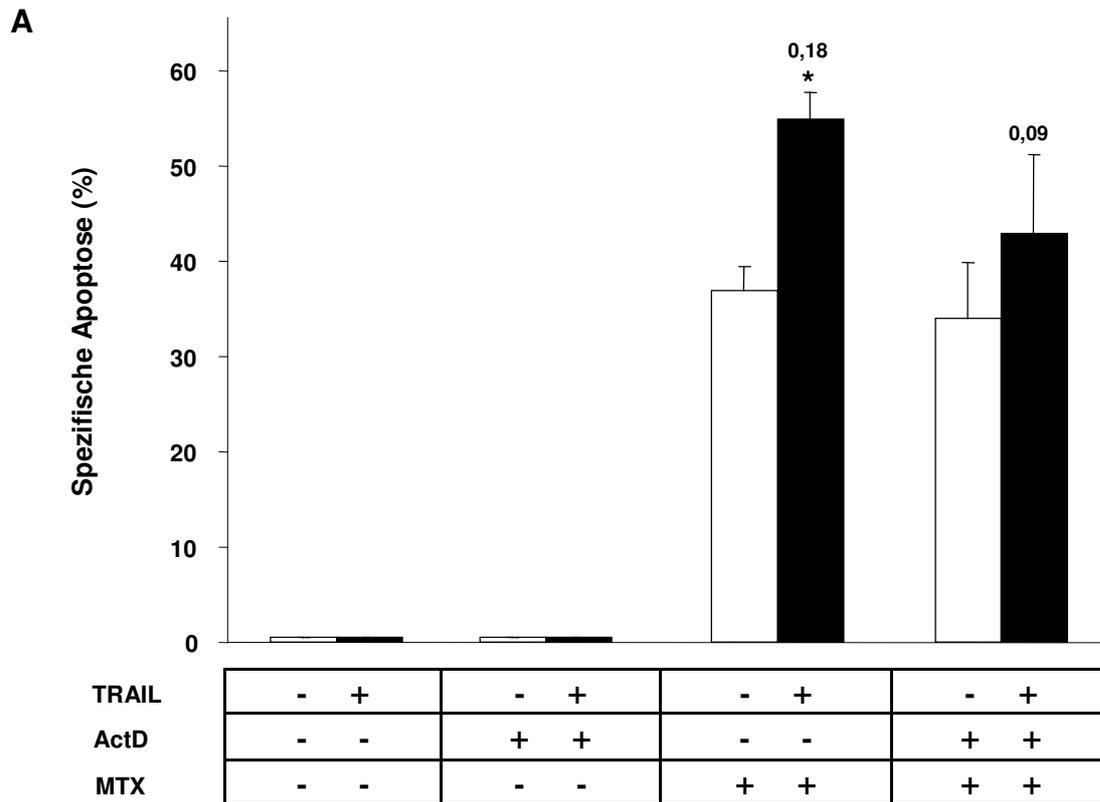


Abbildung 3-6 A und B: Inhibition der Sensitivierung von Methotrexat für TRAIL

J-TR Zellen wurden mit Actinomycin D (ActD, 10 ng/ml (A)) oder Cycloheximid (CHX, 30 ng/ml (B)) für 4 Stunden inkubiert und anschliessend mit Methotrexat (10 nM) für 48 Stunden, gefolgt von TRAIL (1 µg/ml; wo angegeben) für weitere 24 Stunden behandelt. Die Apoptose wurde mittels FACScan gemessen. Der errechnete Fractional Product Wert ist über dem schwarzen Balken angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Einzelexperimenten ± SEM. * $p < 0,05$ RM ANOVA on ranks

3.4 Analyse von Proteinen der Apoptosesignalkaskade

In den folgenden Versuchen wurde die Expression einzelner, für die Zelltodinduktion relevanter Proteine der TRAIL-Apoptosesignalkaskade vor und nach Applikation von Methotrexat überprüft und die Veränderung einzelner Proteine bzw. die Funktionstüchtigkeit des Apoptosesignalwegs nach Stimulation beurteilt. Neben der Rezeptorebene wurden die wichtigsten intrazellulären Signalproteine auf Veränderungen nach Stimulation mit Methotrexat untersucht, um die Auswirkung des Zytostatikums auf die effizientere Zelltodinduktion durch TRAIL genauer zu charakterisieren.

3.4.1 Rezeptorebene

Als erstes Glied innerhalb der TRAIL-Apoptosesignalkaskade wurden die TRAIL-Rezeptoren auf der Zellmembran untersucht. Dabei wurde die Expressionsdichte der einzelnen Rezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmt und das Verhältnis der Zelltod-vermittelnden TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu den beiden „Decoy“ Rezeptoren TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2), die selbst keine Zelltod-induzierende Funktion aufweisen, vor und nach Stimulation mit Methotrexat ermittelt. Die in Abbildung 3-7 dargestellte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) entspricht der Expressionsdichte der verschiedenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Es zeigte sich, dass sowohl die zelltodvermittelnden Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 als auch die „Decoy“ Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 auf der Zellmembran exprimiert wurden. Nach Stimulation mit Methotrexat war die Zunahme der Expressionsdichte aller TRAIL-Rezeptoren nachweisbar. Insgesamt erhöhte sich insbesondere die Oberflächenexpression des „Decoy“ Rezeptors TRAIL-R4 (MFI: 34) und der TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 (MFI: 58) sowie TRAIL-R2 (MFI: 148), während TRAIL-R3 auch nach Inkubation mit Methotrexat nur sehr gering exprimiert wurde (MFI: 7). Insgesamt hatte sich das Verhältnis der zelltodvermittelnden „Death“ Rezeptoren zu den „Decoy“ Rezeptoren auf der Zelloberfläche jedoch nicht verändert.

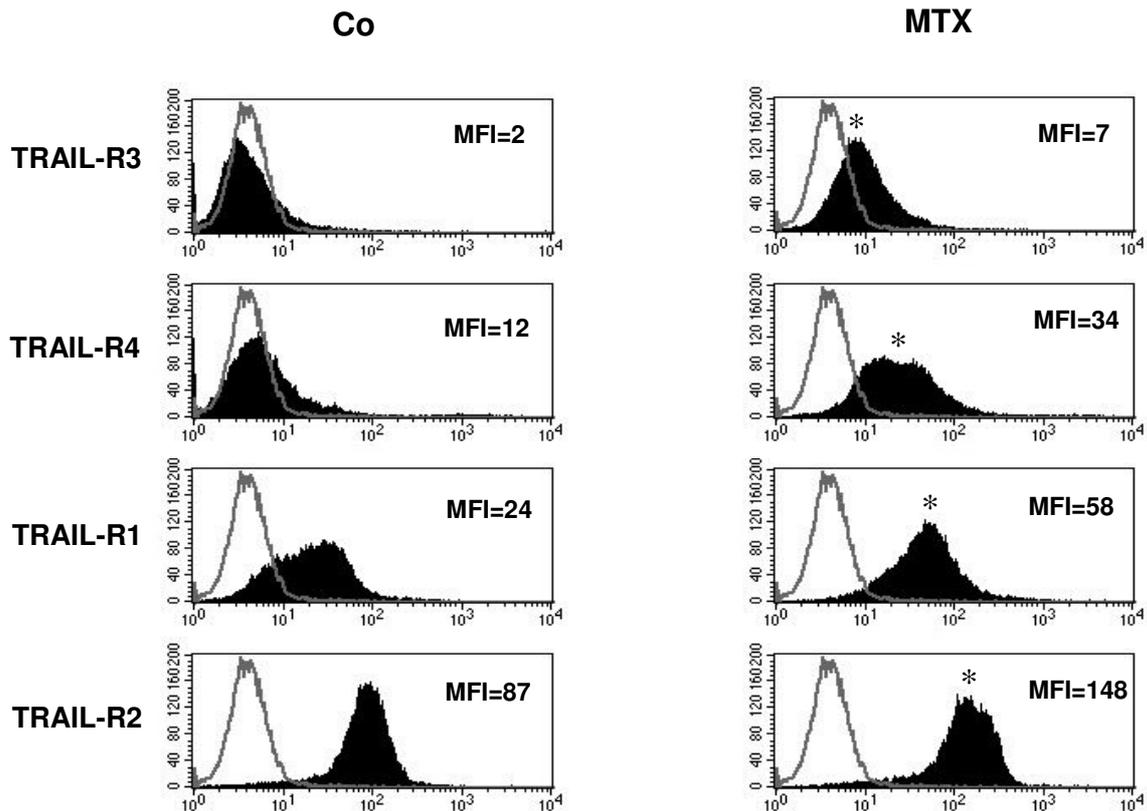


Abbildung 3-7: Hochregulation der vier TRAIL-Rezeptoren durch Methotrexat

J-TR Zellen wurden für 72 Stunden mit oder ohne Methotrexat (MTX, 10 nM) inkubiert und die TRAIL-Rezeptor Expression mittels FACscan gemessen. Dargestellt ist jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) repräsentativ als eines von 6 voneinander unabhängigen Experimenten. co = Kontrolle. Graue Linie = Isotyp Kontrolle. * $p < 0,05$ paired *t*-test gegenüber unstimulierten Zellen

3.4.2 Western Blot Analyse intrazellulärer Proteine

Im nächsten Schritt wurden die intrazellulären Proteine des proximalen und distalen Apoptosesignalwegs mit Hilfe entsprechender Antikörper vor und zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten nach Stimulation mit Methotrexat mittels Western Blot auf mögliche Veränderungen ihrer Expressionsstärke untersucht. Die Ergebnisse der Western Blot Experimente sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

Bei initial fehlender Caspase-8 Bande kam es durch Stimulation mit Methotrexat nach 48 Stunden erstmals zur Ausbildung einer sichtbaren Caspase-8 Bande, deren Expressionsstärke sich über weitere 24 Stunden, nach einer Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden, nochmals verstärkte. Die Expressionslevel von Caspase-10, FADD, FLIP und RIP zeigten sich über die Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden hingegen unverändert.

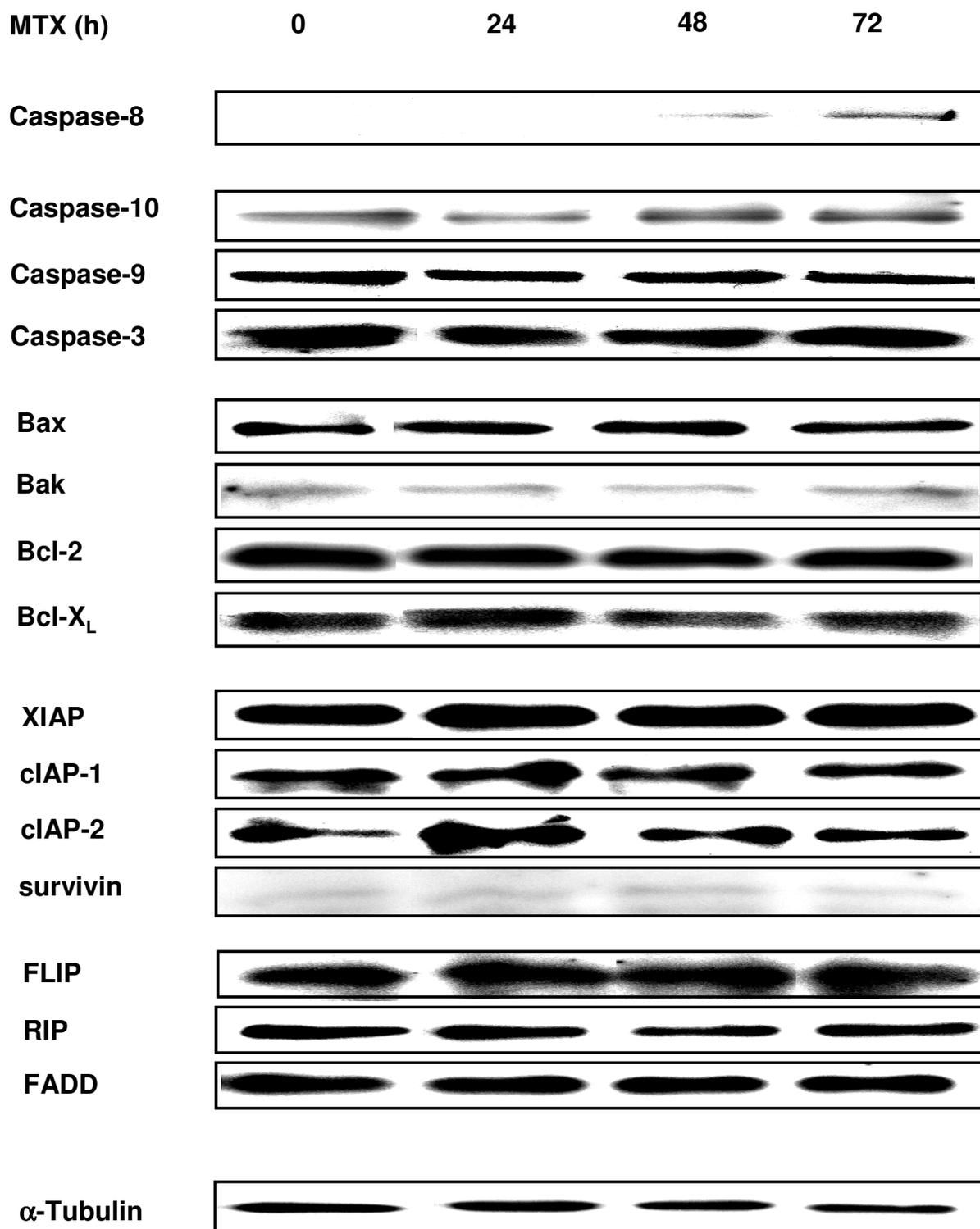


Abbildung 3-8: Einfluss von MTX auf Proteine der TRAIL-Apoptosesignalkaskade

J-TR Zellen wurden mit Methotrexat (MTX, 10 nM) inkubiert. Zelluläres Protein wurde jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und die Western Blot Analyse durchgeführt. α -Tubulin diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Dargestellt ist ein repräsentatives Einzelexperiment aus drei voneinander unabhängigen Experimenten

Des Weiteren wurden verschiedene Moleküle des distalen Abschnitts überprüft. Da JURKAT Zellen zu sogenannten Typ 2 Zellen gezählt werden (Scaffidi *et al.*, 1998), in denen das Mitochondrium eine wichtige Aufgabe bei der rezeptorvermittelten Apoptose übernimmt, wurden die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, Bcl-2 und Bcl-X_L, sowie die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak untersucht, welche die TRAIL-induzierte Apoptose über ihre Wirkung am Mitochondrium regulieren. Zur Überprüfung dieses Teilabschnitts der Signalkaskade wurde Caspase-9 und -3 im Western Blot untersucht. Auch die Mitglieder der IAP-Familie, XIAP, cIAP-1 und cIAP-2, sowie Survivin spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptose distal des Mitochondriums, indem sie Caspasen (Caspase-3, -7, -9) binden und diese so wirkungsvoll inhibieren (Hengartner, 2000). Über die Gesamtkubationszeit von 72 Stunden zeigten sich jedoch bei keinem der genannten Proteine Veränderungen im Expressionslevel nach Stimulation mit Methotrexat.

Um herauszuarbeiten, ob es sich um eine generelle Eigenschaft von Methotrexat handelt, die Caspase-8 Expression zu erhöhen, wurden zusätzliche Western-Blot Experimente mit weiteren Caspase-8 negativen Zelllinien (vgl. 3.2.2) durchgeführt (Abbildung 3-9). Sowohl bei der Leukämiezelllinie CEM-TR, als auch bei den getesteten adhären Zellen CADO und KELLY war bei initial fehlender Caspase-8 72 Stunden nach Stimulation mit Methotrexat die Expression von Caspase-8 nachweisbar. In Übereinstimmung mit den geringer ausgeprägten sensitivierenden Effekten auf diesen Zelllinien, welche in den Stimulationsexperimenten gezeigt (3.2.2) wurden, war das Re-expressionslevel von Caspase-8, insbesondere bei der Zelllinie KELLY, weniger stark ausgebildet.

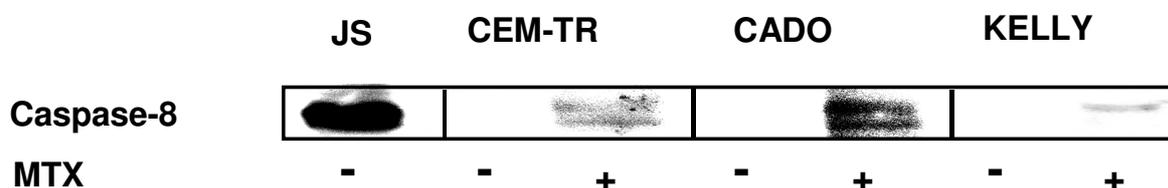


Abbildung 3-9: Einfluss von MTX auf die Expression von Caspase-8

CEM-TR Zellen sowie die adhären Zellen CADO und KELLY wurden mit Methotrexat (MTX, 10 nM) inkubiert wo angezeigt und die Western Blot Analyse durchgeführt. Die Caspase-8 exprimierende Zelllinie JS diente als Positiv- Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Einzelexperiment aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5 Inhibition von Caspase-8

Durch die vorhergehende Western Blot Versuche gelang der Nachweis einer Caspase-8 Re-expression durch Methotrexat in allen getesteten primär Caspase-8 negativen Zelllinien. Um zu überprüfen, ob die Re-expression die Ursache der verbesserten Sensitivität für TRAIL-induzierte Apoptose war, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die sensitivierende Wirkung von Methotrexat für TRAIL durch funktionelle Hemmung von Caspase-8 mittels zIETD, einem spezifischen, irreversiblen Inhibitor, aufgehoben wird (Abbildung 3-10).

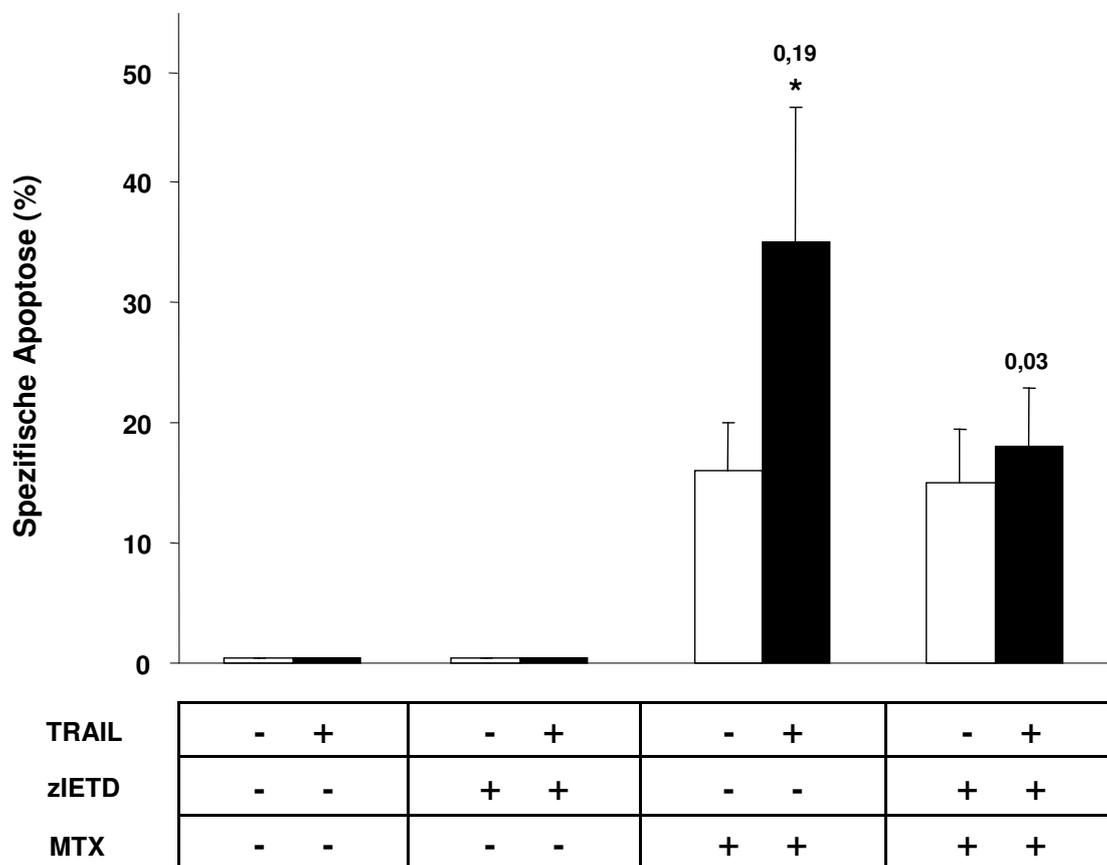


Abbildung 3-10: Inhibition der sensitivierenden Wirkung von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose durch Hemmung von Caspase-8

J-TR Zellen wurden mit Methotrexat (10 nM) für 48 Stunden gefolgt von TRAIL (1 µg/ml; wo angegeben) für weitere 24 Stunden behandelt. 30 Minuten vor TRAIL-Zugabe wurden die Zellen mit zIETD (100µM) inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels FACscan gemessen. Der errechnete Fractional Product Wert ist über dem schwarzen Balken angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Einzelexperimenten ± SEM. * $p < 0,05$ RM ANOVA on ranks

Es zeigte sich eine beinahe vollständige Aufhebung der verstärkten Apoptoseinduktion bei Kombination von Methotrexat und TRAIL in Anwesenheit von zIETD. Dies entspricht einer signifikanten Verringerung des FP Wertes von 0,19 bei Stimulation mit Methotrexat und TRAIL auf 0,03 bei Hemmung von Caspase-8 durch zIETD. Somit spielt Caspase-8 im verwendeten Zellmodell eine wichtige Rolle für die verbesserten Zelltodinduktion durch TRAIL nach Stimulation mit Methotrexat.

Die Apoptoseinduktion durch Methotrexat alleine wurde durch die Zugabe von zIETD nicht beeinflusst. Parallel dazu durchgeführte Versuche mit der parentalen, Caspase-8 positiven Zelllinie JS zeigten ebenfalls eine nahezu vollständige Inhibition der TRAIL-induzierten Apoptose durch zIETD.

Im Anschluss an diese Arbeit wurde in Folgeversuchen gezeigt, dass eine Inhibition der Hochregulation von Caspase-8 mittels shRNA die sensitivierende Wirkung von Methotrexat auf die TRAIL-induzierte Apoptose wirkungsvoll verhindert. Umgekehrt führte die Transfektion der J-TR Zellen mit einem Expressionsplasmid für Caspase-8 zur Wiederherstellung der TRAIL-Sensitivität.

In weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Methotrexat über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 die Hochregulation von Caspase-8 bewirkt. Die strukturelle Analyse der Promotor-region des für Caspase-8 codierenden Gens ergab Bindestellen für verschiedenste Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise p53, NFkB, IRF-1, SP-1 oder AP-1 (Liedtke *et al.*, 2003, Ruiz-Ruiz *et al.*, 2004). Methotrexat-induzierte Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose wurde durch Verwendung von p53 Decoy Nukleotiden, welche die Bindestelle für p53 blockieren, vollständig inhibiert.

4 Diskussion

Apoptose-Resistenz von Tumorzellen gegenüber der Therapie stellt die Hauptursache von Therapieversagen dar und ist verantwortlich für die ungünstige Prognose vieler Tumorerkrankungen (S. Fulda und KM. Debatin, 2004, Rodriguez-Nieto und Zhivotovsky, 2006). Veränderungen in Zelltodsignalwegen der Tumorzellen können Ursache für Apoptose-Resistenz darstellen, wie zum Beispiel der Verlust der Expression intrazellulärer Proteine der Apoptose-Signalkaskade. Ein Beispiel hierfür ist der Verlust von Caspase-8 (Pingoud-Meier *et al.*, 2003, Soung *et al.*, 2005), der hauptsächlich durch epigenetische Regulationen bedingt ist. Der Verlust von Caspase-8 wurde vor allem auf neuroektodermalen Tumoren wie dem kindlichen Neuroblastom beschrieben (Teitz *et al.*, 2000), und Patienten, deren Tumoren kein Caspase-8 Protein exprimieren, haben eine ungünstigere Prognose. Ziel von wissenschaftlichen Anstrengungen ist daher, eine Wiederherstellung der Expression von Caspase-8 zu bewirken. Die vorliegende Arbeit zeigt einen klinisch umsetzbaren Ansatz auf, Caspase-8 in Tumorzellen zu re-exprimieren.

TRAIL gilt als hoffnungsvolles, neues Zytostatikum in der präklinischen Entwicklung, das sich bei selektiver Aktivität gegen Tumorzellen als untoxisch in Tierversuchen und der Phase I Studie am Menschen herausstellte. TRAIL-induzierte Apoptose in Tumorzellen ist vollkommen abhängig von funktioneller Caspase-8. Methotrexat ist ein altbewährtes, Jahrzehnte lang erfolgreich in vielen klinischen Studien eingesetztes Zytostatikum für verschiedenste Tumoren. Der intrazelluläre Signalweg, über den Methotrexat Apoptose in Tumorzellen auslöst, ist heute nicht vollständig verstanden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe nach Beendigung der Doktorarbeit erhobenen Daten zeigen erstmals eine neue Wirkungsweise von Methotrexat: In Tumoren ohne Expression von Caspase-8 ist Methotrexat in der Lage, eine Hochregulation von Caspase-8 zu bewirken und dadurch zu einer Sensitivierung z.B. für TRAIL-induzierte Apoptose zu führen. Transfektion der Tumorzellen mit spezifischer shRNA gegen Caspase-8 sowie der spezifische Caspase-8 Inhibitor zIETD heben die Sensitivierung von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose auf. Hochregulation von Caspase-8 stellt somit einen bisher unbekanntem Mechanismus dar, über den Methotrexat Apoptose in Tumorzellen vorbereitet.

Auf molekularer Ebene führte Methotrexat zur Re-expression der zuvor fehlenden Caspase-8 und zur gleichzeitigen Hochregulation der Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sowie der Decoy Rezeptoren TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) auf der Zelloberfläche. Die verstärkte Expression der TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 durch Zytostatika auf unterschiedlichsten Zelllinien und eine damit verbundene verstärkte Apoptoseinduktion durch TRAIL wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Fulda und Debatin, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden Caspase-8 negative Zellen verwendet, welche bereits vor Stimulation mit Methotrexat beide Todes- und Decoyrezeptoren an der Zelloberfläche exprimierten. Nach Stimulation mit Methotrexat war eine verstärkte Expression aller Rezeptoren ohne Veränderung des Verhältnisses der Todes- zu den Decoyrezeptoren nachweisbar. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe nach Abschluss der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass die TRAIL-Rezeptoren nicht für eine Sensitivierung der Tumorzellen für TRAIL-induzierte Apoptose durch Methotrexat verantwortlich sind.

Seit längerem ist bekannt, dass nicht nur Caspase-8, sondern auch Caspase-10 mittels ihrer DED ein Todessignal weitergeben kann (Walczak und Sprick, 2001). Ob Caspase-10, die ebenfalls an den DISC bindet, Caspase-8 funktionell ersetzen kann bzw. ob ihr eine ähnlich wichtige Bedeutung bei der Zelltodinduktion und der Entwicklung von Apoptoseresistenz zukommt, wird bisher kontrovers diskutiert (Kischkel *et al.*, 2001, Sprick *et al.*, 2002, Engels *et al.*, 2005). Vor Kurzem wurde von einer anderen Gruppe beschrieben, dass Caspase-8 und -10, trotz gewisser überlappender Funktionen, eine nicht-redundante Rolle im Apoptosesignalweg spielen (Fischer *et al.*, 2005). In unserem untersuchten Zellmodell zeigten sich alle Caspase-8 negativen Zelllinien trotz ausreichender Expression von Caspase-10 auch bei langen Inkubationszeiten TRAIL-resistent. Das Expressionslevel von Caspase-10 änderte sich auch nach Stimulation mit Methotrexat nicht im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Im hier untersuchten Zellmodell war ein funktioneller Ersatz der fehlenden Caspase-8 durch Caspase-10 nicht nachweisbar.

Der Verlust von Caspase-8 führt zu Entwicklung von Resistenz gegen die Zelltodinduktion durch TRAIL über die Todesrezeptoren DR4 und DR5 (Debatin *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit untersuchten derivativen Zelllinien J-TR und CEM-TR entstanden durch Inkubation der jeweiligen parentalen Zelllinie JURKAT bzw. CEM mit ansteigenden TRAIL-Dosen und konsekutivem Verlust der Caspase-8 Expression (Ehrhardt *et al.*, 2003). J-TR und CEM-TR Zellen sind stark auf die Expression von

Caspase-8 angewiesen. Bereits eine im Western Blot vergleichsweise gering ausgeprägte Re-expression von Caspase-8 durch Methotrexat führte auf J-TR und CEM-TR Zellen zu einer deutlichen Sensitivierung der Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose und unterstreicht nochmals die Bedeutung dieser proximalen Caspase für die Zelltodinduktion. Die Transfektion der Caspase-8 negativen J-TR Zellen mit einem Expressionsplasmid für Caspase-8 führte auch bei geringer Expression des rekombinanten Proteins zur Wiederherstellung der Sensitivität für TRAIL-induzierte Apoptose (Ehrhardt *et al.*, 2007, data submitted for publication).

In unserem Zellmodell zeigte sich die Hochregulation von Caspase-8 durch Methotrexat als ursächlicher Signalmechanismus der Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose. Aufgrund bisher erhobener Ergebnisse besitzt Caspase-8 als Bestandteil des TRAIL-DISC essentielle Bedeutung für die Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren (Debatin und Krammer, 2004). Fehlt Caspase-8, wird das Todessignal auch bei funktionstüchtigem Rezeptor nicht ins Zellinnere übermittelt. Nach irreversibler Hemmung von Caspase-8 mittels zIETD wurde die Sensitivierung der Zellen durch Methotrexat vollständig aufgehoben. Ebenso kam es nach Transfektion der Zellen mit shRNA gegen Caspase-8 zu einer relevanten Abschwächung des sensitivierenden Effektes von Methotrexat (Ehrhardt *et al.*, 2007, data submitted for publication). Es wurde somit erstmals gezeigt, dass Methotrexat über die Hochregulation von Caspase-8 als eines der zentralen pro-apoptotischen Proteine Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert.

In der Arbeitsgruppe wurde vor Kurzem gezeigt, dass der Verlust der Caspase-8 Expression bei Stimulation mit TRAIL zur Manifestation eines neuen Phänotyps führte: Caspase-8 negative Tumorzellen wie zum Beispiel J-TR Zellen begannen nach TRAIL Stimulation durch die Aktivierung von NFκB vermehrt zu proliferieren (Ehrhardt *et al.*, 2003, Baader *et al.*, 2005). Diese Daten legen nahe, dass Patienten mit Tumorzellen, die nach TRAIL-Stimulation vermehrt proliferieren, von einer Therapie mit TRAIL ausgeschlossen werden sollten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass durch Methotrexat eine TRAIL-Therapie in Caspase-8 negativen Zellen möglich ist, wenn Methotrexat diese Zellen durch Re-expression von Caspase-8 für die Apoptoseinduktion durch TRAIL sensitiviert.

Insbesondere bei kindlichen Tumoren (Medulloblastom, Neuroblastom) ist der Verlust von Caspase-8 zumeist durch epigenetische Regulationsmechanismen wie beispielsweise die Hypermethylierung der Promotorsequenz des Zielgens bedingt.

Der Verlust von Caspase-8 spielt auch klinisch in Bezug auf Apoptoseresistenz und Tumorprogression eine wichtige Rolle. Der Caspase-8-Status von Tumoren gilt als ein bedeutender Prognosefaktor für das Ansprechen einer Chemotherapie, die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten bzw. die Entwicklung eines Rezidivs (Pingoud-Meier *et al.*, 2003, Soung *et al.*, 2005). Durch demethylierende Substanzen wie Azacythidin oder die Aktivierung der STAT-1/IRF-1 Signalkaskade über Interferon- γ ist *in vitro* bereits eine Re-expression von Caspase-8 gelungen (Fulda *et al.*, 2001, Fulda *et al.*, 2001, Ruiz-Ruiz *et al.*, 2004, Teitz *et al.*, 2000). Diese beiden Substanzen werden wegen des Nebenwirkungsprofils im Rahmen der Polychemotherapie in aktuellen Protokollen jedoch nicht angewendet.

Hier wird erstmals gezeigt, dass Methotrexat, ein vielfach erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetztes Zytostatikum, Caspase-8 in verschiedenen Zelllinien re-exprimiert. Die Hochregulation von Caspase-8 wurde dabei nicht nur auf Leukämiezelllinien, sondern auch auf den adhärent wachsenden Neuroblastomzelllinien CADO und KELLY nachgewiesen. Hochregulation von Caspase-8 durch Methotrexat stellt demnach einen auf vielen verschiedenen Tumorzellen beobachtbaren Mechanismus dar. Der sensitivierende Effekt von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose wurde auch auf primären Leukämiezellen untersucht und in zahlreichen Proben nachgewiesen. Von besonderer Relevanz ist dabei die Untersuchung der TRAIL-resistenten Patientenproben, die durch Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert wurden. Die Re-expression von Caspase-8 durch Methotrexat stellt einen wichtigen neuen Mechanismus dar, um auch in resistenten Tumorzellen wirkungsvoll Apoptose zu induzieren und eine Kombinationstherapie mit TRAIL zu ermöglichen. Zusätzliche Experimente mit primären Zellen erwachsener Patienten wären weiterführend von besonderem Interesse, da aufgrund des grösseren Proben- bzw. Zellvolumens die Gewinnung von Expressionsdaten bezüglich des Caspase-8 Status der Zellen möglich ist.

Chemotherapie wird grundsätzlich als Gabe von verschiedenen Therapeutika, also als Polychemotherapie durchgeführt. TRAIL gilt als Zytostatikum der Zukunft, welches in zukünftige Schemata der Polychemotherapie mit aufgenommen werden soll. Die dargestellten Daten legen nahe, dass eine Kombination von TRAIL mit Methotrexat im klinischen Rahmen sinnvoll wäre, da Methotrexat durch Hochregulation von Caspase-8 sowohl TRAIL-induzierte Proliferation verhindert, als auch TRAIL-induzierte Apoptose verstärkt. Weitere Studien sind notwendig, um die

Wirksamkeit der kombinierten Therapie aus Methotrexat und dem Todesliganden TRAIL in vivo zu evaluieren unter besonderer Berücksichtigung der Expression des Apoptose-Signalproteins Caspase-8.

5 Zusammenfassung

Eines der Hauptprobleme bei der Behandlung bösartiger Tumore ist das Auftreten von Resistenz gegen die Therapie. Apoptose-Resistenz kann durch den Verlust von intrazellulären Apoptose-Signalproteinen bedingt sein, wie zum Beispiel dem von Caspase-8. Verlust von Caspase-8 führt zur Resistenz gegen Apoptose-Induktion zum Beispiel durch TRAIL, einem neuen Zytostatikum, welches sich zur Zeit in der klinischen Erprobung in Phase II befindet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Tumorzellen, die einen Verlust von Caspase-8 und eine dadurch bedingte Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose zeigten. Wir fanden, dass Methotrexat, ein klinisch seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetztes Zytostatikum, eine Sensitivierung dieser Tumorzellen, wie auch primärer kindlicher Leukämiezellen für TRAIL-induzierte Apoptose ermöglichte. Auf der Suche nach dem zu Grunde liegenden molekularen Mechanismus zeigte sich, dass eine Inhibition der Protein-Neosynthese die Sensitivierung von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose verminderte. Unter verschiedenen untersuchten Molekülen der Apoptose-Signalkaskade wurde die Expression des Proteins Caspase-8 durch Methotrexat hochreguliert. Die biochemische Inhibition von Caspase-8 mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors führte zu einer vollständigen Aufhebung der Sensitivierung von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose. Experimente, die im Anschluss an die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass eine Inhibition der Hochregulation von Caspase-8 durch shRNA gegen Caspase-8 die Sensitivierung von Methotrexat für TRAIL-induzierte Apoptose ebenso verhinderte. Somit stellte die Expression von Caspase-8 durch Methotrexat den molekularen Mechanismus für die Sensitivierung der Tumorzellen für TRAIL-induzierte Apoptose dar.

Unsere Daten identifizierten die Regulation von Caspase-8 als bisher unbekanntes Wirkungsmethode von Methotrexat bei der Tumorthherapie, die eine Sensitivierung der Tumorzellen für die Induktion von Apoptose ermöglicht und für die erfolgreiche Verwendung des Medikamentes mitverantwortlich sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Appel IM:** Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after one intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of childhood ALL. *Leukemia* 17: 2254-2256 (2003)
- Almasan A und Ashkenazi A:** Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine&Growth Factor Rev.* 14: 337-348 (2003)
- Arizono Y, Yoshikawa H, Naganuma H, Hamada Y, Nakajima Y, Tasaka K:** A mechanism of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of newly established glioma cell line and sensitisation to TRAIL by genotoxic agents. *Br. J. Cancer* 88: 298-306 (2003)
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, Mc Murtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrock Z, Schwall RH:** Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104: 155-162 (1999)
- Baader E, Toloczko A, Fuchs U, Schmid I, Beltinger C, Ehrhardt H, Debatin KM, Jeremias I:** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects. *Cancer Res.* 65: 7888-95 (2005)
- Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W:** Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 20: 2190-2196 (2001)
- Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P:** Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 275: 20632-7 (2000)

- Bouralexis S, Findlay DM, Atkins GJ, Labrinidis A, Hay S, Evdokiou A:** Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br. J. Cancer* 89: 206-214 (2003)
- Buchsbaum DJ, Zhou T, Lobuglio AF:** TRAIL receptor-targeted therapy. *Future Oncology* 2: 493-508 (2006)
- Burns TF und El-Deiry WS:** Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive Colon Carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. *J. Biol. Chem.* 276: 37879-37886 (2001)
- Charles B, Schild P, Steer P, Cartwright D, Donovan T:** Pharmacokinetics of dexamethasone following single-dose intravenous administration to extremely low birth weight infants. *Dev. Pharmacol. Ther.* 20(3-4): 205-210 1993
- Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross B, Rehemtulla A:** Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *PNAS* 97(4): 1754-1759 (2000)
- Debatin KM:** Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53: 153-159 (2004)
- Debatin KM und Krammer PH:** Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23: 2950-2966 (2004)
- Déjosez M, Ramp U, Mahotka C, Krieg A, Walczak H, Gabbert HE, Gerharz CD:** Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ.* 7: 1127-1136 (2000)
- Di Pietro R, Secchiero P, Rana R, Gibellini D, Visani G, Bemis K, Zamai L, Miscia S, Zauli:** Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1. *Blood* 97: 2596-2603 (2001)

- Di Pietro R und Zauli G:** Emerging Non-Apoptotic Functions of Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)/Apo2L. *J. Cell. Physiol.* 201: 331-340 (2004)
- Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, Brodeur GM:** Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* 61: 1314-1319 (2001)
- Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM und Jeremias I:** TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF κ B. *Oncogene* 22: 3842-3852 (2003)
- Ehrhardt H, Häckel S, Wittmann S, Borkhardt A, Toloczko A, Debatin KM, Fulda S, Jeremias I:** Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of Caspase-8 in tumor cells (2007; paper submitted for publication)
- Emery JG, Mc Donnell, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR:** Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem* 273: 14363-14367 (1998)
- Engels I, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K, Jänicke R:** Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2808-2818 (2005)
- Estlin EJ:** The clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase, anthracyclines and cyclophosphamide in relation to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br. J. Haematol.* 110: 780-790 (2000)
- Estlin EJ, Lowis SP, Hall AG:** Optimizing antimetabolite-based chemotherapy for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br. J. Haematol.* 110: 29-40 (2000)

- Estlin EJ, Yule SM, Lowis SP:** Consolidation therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside, epipodophyllotoxins and cyclophosphamide. *Cancer Treatment Rev.* 27: 339-350 (2001)
- Evans WE, Hutson PR, Stewart CF, Cairnes DA, Bowman WP, River G, Crom WR:** Methotrexate cerebrospinal fluid and serum concentrations after intermediate-dose methotrexate infusion. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33(3): 301-7 (1983)
- Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, Findlay DM:** Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to APO2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* 99: 491-504 (2002)
- Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K:** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10: 76-100 (2003)
- Fischer U und Schulze-Osthoff K:** New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharm. Rev.* 57: 187-215 (2005)
- Fischer U, Stroh C, Schulze-Osthoff K:** Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 25: 152-159 (2005)
- Fridmann JS und Lowe SW:** Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22: 9030-9040 (2003)
- Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM:** Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* 2: 574-577 (1996)
- Frosr BM, Eksborg S, Bjork O, Abrahamson J, Behrendtz M, Casto A, Forestier E, Lonnerholm G:** Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study. *Med. Pediatr. Oncol.* 38(5): 329-37 (2002)

- Fulda S, Meyer E, Friesen C, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM:** Cell type specific activation of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 1063-1075 (2001)
- Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM:** Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20: 5865-5877 (2001)
- Fulda S und Debatin KM:** INF γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 21: 2295-2308 (2002)
- Fulda S und Debatin KM:** Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1705: 27-41 (2004)
- Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC, Krueger A, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Stremmel W, Krammer PH, Walczak H:** Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ.* 11: 86-96 (2004)
- Gibson SP, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL:** Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol. Cell Biol.* 20: 205-212 (2000)
- Gong B und Almasan A:** Apo2 Ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells. *Cancer Res.* 60 : 5754-5760 (2000)
- Green DR und Kroemer G:** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629 (2004)
- Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ:** Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* 161: 2833-2840 (1998)

- Griffith TS und Kemp TJ:** The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52: 175-184 (2003)
- Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC:** Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19: 4604-4610 (2000)
- Von Haefen C, Gillissen B, Hemmati PG, Wendt J, Guner D, Mrozek A, Belka C, Dorken B, Daniel PT:** Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 50: 8320-32 (2004)
- Hassan M, Svevsson USH, Ljungman P, Björkstrand B, Olsson H, Bielenstein M, Abdel-Rehim M, Nilsson C, Johansson M, Karlsson MO:** A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients. *J. Clin. Pharmacol.* 48: 669-677 (1999)
- Held J und Schulze-Osthoff K:** TRAIL in cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 4: 243-252 (2001)
- Hengartner MO:** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776 (2000)
- Hernandez A, Wang Q, Schwarz SA, evers BM:** Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J. Gastrointest. Surg.* 5: 56-65 (2001)
- Herr I, Debatin KM:** Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98: 2603-2614 (2001)
- Hotta T, Suzuki H, Nagai S, Yamamoto K, Imakiire A, Takada E, Itoh M, Mizuguchi J:** Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J. Orthop. Res.* 21: 949-957 (2003)

- Jazirehi AR, Ng CP, Gan XH, Schiller G, Bonavida B:** Adriamycin sensitizes the adriamycin-resistant 8226/Dox40 human multiple myeloma cells to Apo2L/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated (TRAIL) apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 7(12): 3874-83 (2001)
- Jeremias I, Herr I, Boehler T, Debatin KM:** TRAIL/Apo-2-Ligand induced apoptosis in T-cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 143-152 (1998)
- Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, Herr I, Wirth T, Debatin KM:** Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 91: 4624-31 (1998)
- Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC :** Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* 6: 564-567 (2000)
- Johnston JB, Kabore AF, Strutinsky J, Hu X, Paul JT, Kropp DM, Kuschak B, Begleiter A, Gibson SB:** Role of the TRAIL/APO2-L death receptors in chlorambucil- and fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 22: 8356-8369 (2003)
- Jones DT, Ganeshaguru K, Mitchell WA, Feroni L, Baker RJ, Prentice HG, Mehta AB, Wickremasinghe RG:** Cytotoxic drugs enhance the ex vivo sensitivity of malignant cells from a subset of acute myeloid leukaemia patients to apoptosis induction by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Br. J. Haematol.* 121: 713-720 (2003)
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J:** Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8:1001-1008 (1998)
- Karin M, Cao Y, Greten F, Li Z-W:** NFkB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature* 2: 301-310 (2002)
- Kaufmann SH, Earnshaw WC:** Induction of Apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 256: 42-49 (2000)
- Kaufmann SH und Steensma DP:** On the TRAIL of a new therapy for leukaemia. *Leukemia* 19: 2195-2202 (2005)

- Kelley SK, Harris LA, Xie D, Deforge L, Totpal K, Bussiere J, Fox JA:** Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharm. Ex. Ther.* 299: 31-38 (2001)
- Kelly MM, Hoel BD, Voelkel-Johnson C:** Doxorubicin pretreatment sensitizes prostate cancer cell lines to TRAIL induced apoptosis which correlates with the loss of c-FLIP expression *Cancer Biol. Ther.* 1: 520-527 (2002)
- Kim P, Mahidhara R, Seol D-W:** The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 4: 293-296 (2001)
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A:** Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276: 46639-46646 (2001)
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S:** FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 21: 8247-8254. (2001)
- Kroemer G und Reed JC:** Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6: 513-519 (2000)
- Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V, Tschopp J, Solary E, Dimanche-Boitrel MT:** Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 22: 1807-1826 (2003)
- Lawrence DA, Shahrockh Z, Marsters SA, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A:** In vitro hepatocyte toxicity of Apo2L/TRAIL is associated with aberrant biochemical properties of nonoptimized recombinant soluble ligand preparations. *Nat. Med.* 7: 383-386 (2001)
- Le Blanc HN und Ashkenazi A:** Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.* 10: 66-75 (2003)

- Liedtke C, Groger N, Manns MP, Trautwein C:** The human caspase-8 promotor sustains basal activity through SP1 and ETS-like transkription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 278: 27593-27604 (2003)
- Lin Y, Devin A, Cook A, Keane MM, Kelliher M, Lipkowitz S, Liu ZG:** The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I κ B kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.* 20: 6638-6645 (2000)
- Liu W, Bodle E, Chen JY, Gao M, Rosen GD, Broaddus VC:** Tumor necrosis factor-related apoptosis -inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol:* 25: 111-118 (2001)
- Lowe EC, Kitchen BJ, Erdmann G, Stork LC, Bostrom BC, Hutchinson R, Holcenberg J, Reaman GH, Woods W, Franklin J, Widemann BC, Balis FM, Murphy RF, Adamson PC:** Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of thioguanine in children with acute lymphoblastic leukemia : a collaborative Pediatric Oncology Branch, NCI, and Children's Cancer Group study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47: 199-205 (2001)
- Lewis SP, Pearson ADJ, Newell DR, Cole M:** Etoposide pharmacokinetics in children: the development and prospective validation of a dosing equation. *Cancer Res.* 53: 4881-4889 (1993)
- Miao L, Yi P, Wang Y, Wu M:** Etoposide upregulates bax-enhancing tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Eur. J. Biochem.* 270: 2721-2731 (2003)
- Mizutani Y, nakanishi H, Yoshida O, Fukushima M, Bonavida B, Miki T:** Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 38: 167-176 (2002)

- Mizutani Y, Nakao M, Ogawa O, Yoshida O, Bonavida B, Miki T:** Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to tumor necrosis factor related inducing ligand mediated apoptosis by cisplatin and carboplatin. *J. Urol.* 165: 263-270 (2001)
- Morgan M, Williams BA, Blay J, Hoskin DW:** Chemosensitization of T-47D breast carcinoma cells to TRAIL and Fas receptor-induced killing. *Anticancer Res.* 22: 673-676 (2002)
- Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang H-J S:** Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 60: 847-853 (2000)
- Nagane M, Huang H-J S, Cavenee WK:** The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* 6: 191-197 (2001)
- Naka T, Sugamura K, Hylander BL, Widmer MB, Rustum YM und Repasky EA:** Effects of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Alone and in Combination with Chemotherapeutic Agents on Patients' Colon Tumors Grown in SCID Mice. *Cancer Res.* 62: 5800-5806 (2002)
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F und Riccardi C:** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139:271-279 (1991)
- Nimmanapalli R, Perkins CL, Marianagelli O, O'Bryan E, Nygen D, Bhalla KN:** Pretreatment with paclitaxel enhances Apo-2 ligand/tumor necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res.* 61: 759-763 (2001)
- Nitsch R, Bechmann I, deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, ZippF:** Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 356: 827-828 (2000)

- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S:** Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 64: 806-809 (1993)
- Ohtsuka T, Buchsbaum D, Oliver P, Makhija S, Kimberly R, Zhou T:** Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. *Oncogene* 22: 2034-2044 (2003)
- Ozoren N und El-Deiry WS:** Defining characteristics of types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 4: 551-557 (2002)
- Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, Rorke LB, Phillips PC, Shalaby T, Grotzer MA:** Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavourable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clin. Cancer Res.* 9: 6401-6409 (2003)
- Qin J-Z, Charturvedi V, Bonish B, Nickoloff BJ:** A tale of three TRAILS: choosing the best therapeutic path to avoid premature apoptosis of normal epidermal cells. *Nat. Med.* 7: 385-386 (2001)
- Ray S und Almasan A:** Apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts by combined treatment with Apo2ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11. *Cancer Res.* 63: 4713-23 (2003)
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH:** Defying death after DNA damage. *Nature* 407: 777-783 (2000)
- Roa WH, Chen H, Fulton D, Gulavita S, Shaw A, Th'ng J, Farr-Jones M, Moore R, Petruk K:** X-linked inhibitor regulating TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant human primary glioblastoma cells. *Clin. Invest. Med.* 26 231-242 (2003)
- Rodriguez-Nieto S und Zhivotovsky B:** Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. *Curr. Pharm. Des.* 12: 4411-25 (2006)

- Röhn T, Wagenknecht B, Roth W, Naumann U, Gulbins E, Krammer PH, Walczak H, Weller M:** CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome *c* release. *Oncogene* 20: 4128-4137 (2001)
- Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodóvar C, Rodríguez A, Ortiz-Ferrón G, Redondo JM, López-Rivas A:** The up-regulation of human caspase-8 by Interferon- γ in breast tumor cells requires the induction and activation of the transcription factor Interferon regulatory Factor-1. *J. Biol. Chem.* 279: 19712-19720 (2004)
- Salvesen GS, Duckett CS:** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* 3: 401-410. (2002)
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li, F, Tomaselli K, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME:** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17(6): 1675-1687 (1998)
- Shin EC, Seong YR, Kim CH, Kim H, Ahn YS, Kim K, Kim SJ, Hong SS, Park JH:** Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp. Mol. Med.* 34: 114-122 (2002)
- Siervo-Sassi RR, Marrangoni AM, Feng X, Naoumova N, Winans M, Edwards RP, Lokshin A:** Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 190: 61-72 (2003)
- Singh TR, Shankar S, Chen X, Asim M, and Srivastava RK:** Synergistic Interactions of Chemotherapeutic Drugs and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand/Apo-2 Ligand on Apoptosis and on Regression of Breast Carcinoma *in Vivo*. *Cancer Res*: 63: 5390-5400 (2003)
- Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H:** Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21(17): 4520-4530 (2002)
- Srivastava RK:** TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 3: 535-546 (2001)

- Song JH, Song DK, petruk KC, Hao C:** Cisplatin down-regulation of cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory proteins to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human melanoma cells. *Clin. Cancer Res.* 9: 4255-4266 (2003)
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, Jang J, Park YG, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH:** CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 65: 815-821 (2005)
- Suh WS, Kim YS, Schimmer AD, Kitada S, Minden M, Andreeff M, Suh N, Sporn M, Reed JC:** Synthetic triterpenoids activate a pathway for apoptosis in AML cells involving downregulation of FLIP and sensitization to TRAIL. *Leukemia* 17: 2122-2129 (2003)
- Tartaglia LA, Goeddel DV:** Two TNF receptors. *Immunol. Today* 13: 151-153 (1992)
- Teitz T, Wie T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look T, Lahti JM, Kidd VJ:** Caspase-8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of *MYCN*: *Nat. Med.* 6: 529-535 (2000)
- Thornberry NA und Lazebnik Y:** Caspases: Enemies Within. *Science* 281: 1312-1316 (1998)
- Tomek S, Koestler W, Horak P, Grunt T, Brodowicz T, Pribill I, Halaschek J, Haller G, Wiltschke C, Zielinski CC, Krainer M:** TRAIL-induced apoptosis and interaction with cytotoxic agents in soft tissue sarcoma cell lines. *Eur. J. Cancer* 39: 1318-1329 (2003)
- van Valen F, Fulda S, Schafer KL, Truckenbrod B, Hotfilder M, Poremba C, Debatin KM, Winkelmann W:** Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. normal human cells. *Int. J. Cancer* 107: 929-940 (2003)

- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, beck JS, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D:** Targeted disruption of the mouse caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 is lethal prenatally *Immunity* 9: 267-276 (1998)
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P:** TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 7: 449-459 (2002)
- Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M:** Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* 51: 1078-1085 (1991)
- Wang S und El-Deiry WS:** TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628-8633 (2003)
- Wang S und El-Deiry WS:** Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy. *PNAS* 100: 15095-15100 (2003)
- Walczack H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JCL, Lynch DH:** Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat. Med.* 5: 157-163 (1999)
- Walczak H und Sprick MR:** Biochemistry and function of the DISC. *TRENDS Biochem. Science* 26: 452-453 (2001)
- Wen J, Nimmanapalli R, Nguyen D, Perkins C, Worthington E, Bhalla K:** Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 96: 3900-3906 (2000)
- Webb:** In: *Enzymes and Metabolic Inhibitors Vol.1:* 487-512 New York Academy Press

- Wu X, Kakehi Y, Mizutani Y, Nishiyama H, Kamoto T, Megumi Y, Ito N, Ogawa O:** Enhancement of TRAIL/APO2L-mediated apoptosis by Adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 104: 409-417 (2003)
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR:** Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306 (1980)
- Xiang H, Fox JA, Totpal K, Aikawa M, Dupree K, Sinicropi D, Lowe J, Escandón E:** Enhanced tumor killing by Apo2L/TRAIL and CPT-11 co-treatment is associated with p21 cleavage and differential regulation of Apo2L/TRAIL ligand and its receptors *Oncogene* 21: 3611-3619 (2002)
- Zuzak TJ, Steinhoff DF, Sutton LN, Phillips PC, Eggert A, Grotzer MA:** Loss of *caspase-8* mRNA expression is common in childhood neuroectodermal brain tumor /medulloblastoma. *Eur. J. Cancer* 38: 83-91 (2002)

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Fr. PD Dr. med. I. Jeremias für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die sehr gute fachliche Betreuung während der Durchführung meiner Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. med. H. Ehrhardt bedanken für die hervorragende Betreuung während der Umsetzung meiner Arbeit, sowie die zu jeder Zeit geduldige Beantwortung offener Fragen die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Petra Berger und Daniela Foettinger möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Ebenso danke ich meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums.

8 Lebenslauf

Name: Wittmann
Vorname: Stefanie Christina
Geburtsdatum: 03.03.1978
Geburtsort: München

Schulbildung:

1984 - 1988 Grundschule in Hohenschäftlarn
1988 – 1997 Gymnasium der Benediktiner Kloster
Schäftlarn

Hochschulbildung:

1997 – 2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München:
1999 Ärztliche Vorprüfung
2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 – 2003 Doktorarbeit in der onkologischen Abteilung
des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals;
Arbeitsgruppe Apoptose
2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2005 – 12/2006 Assistenzärztin am Spitalzentrum Biel,
Schweiz
Abteilung Chirurgie
Seit 02/2007 Assistenzärztin am Poole General Hospital,
England
Abteilung Paediatric