

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Reinhardt
Abt. Hämatologie / Onkologie

**BESCHLEUNIGTE PROLIFERATION
VON TUMORZELLEN ALS NEUE UNERWÜNSCHTE
WIRKUNG VON ZYTOSTATIKA**

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

vorgelegt von
Naschla Kohistani

aus
Kabul

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Irmela Jeremias

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Christina T. Rieger
PD Dr. med. Simon Rothenfußer
Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2010

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3	EINLEITUNG.....	6
3.1	Hintergrund	6
3.2	TRAIL.....	7
3.2.1	<i>Trail als mögliches Tumortherapeutikum</i>	7
3.2.2	<i>Allgemeines zu TRAIL</i>	9
3.2.3	<i>TRAIL und nicht- / anti-apoptotische Funktionen</i>	10
3.2.4	<i>Definition der Gruppen P, AP, A und O</i>	13
3.3	Zytostatika.....	13
3.3.1	<i>Allgemeines zu Zytostatika</i>	13
3.3.2	<i>Zytostatika- Einteilung</i>	15
3.4	Fragestellung	16
4	MATERIAL UND METHODEN	17
4.1	Material	17
4.1.1	<i>Antikörper</i>	17
4.1.2	<i>Chemikalien</i>	17
4.1.3	<i>Geräte</i>	18
4.1.4	<i>Proteinaseinhibitoren</i>	18
4.1.5	<i>Puffer, Medien und andere Lösungen</i>	18
4.1.6	<i>Stimulantien</i>	20
4.1.7	<i>Software</i>	20
4.1.8	<i>Sonstiges</i>	21
4.1.9	<i>Vektoren</i>	21
4.1.10	<i>Zelllinien</i>	21
4.2	Methoden	22
4.2.1	<i>Zellkultur</i>	22
4.2.2	<i>Proliferationsmessung durch Cellscreen</i>	24
4.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	26
4.2.4	<i>Durchflusszytometrie</i>	27
4.2.5	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	29
5	ERGEBNISSE	33

5.1	TRAIL-induzierte Proliferation	33
5.1.1	<i>Einleitung</i>	33
5.1.2	<i>TRAIL-induzierte Proliferation auf KELL Y-Zellen</i>	34
5.1.3	<i>Aktivierung von NF-κB auf KELL Y-Zellen</i>	35
5.1.4	<i>Inhibition von TRAIL-induzierter Proliferation und Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch molekulare Inhibition von NF-κB</i>	37
5.2	Zytostatika-induzierte Proliferation	44
5.2.1	<i>Proliferation durch einen Antimetaboliten</i>	44
5.2.2	<i>RH 30- und SAOS-2-Zellen</i>	45
5.2.3	<i>Zytostatika-induzierte Proliferation auf CADO- und MCF-7-Zellen</i>	46
5.2.4	<i>CADO-Zellen</i>	47
5.2.5	<i>MCF-7-Zellen</i>	48
5.2.6	<i>Primäre leukämische Zellen</i>	50
6	DISKUSSION	54
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
8	LITERATURVERZEICHNIS	62
9	DANKSAGUNG	73
10	LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumine
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D	Deutschland
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence-activated cell sorter</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
Rpm	Revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

3 EINLEITUNG

3.1 HINTERGRUND

Das Ziel der Therapie von Tumoren besteht in der effektiven, selektiven und nebenwirkungsarmen Beseitigung der Tumorzellen. Tumorerkrankungen werden heute vor allem mit folgenden vier Ansätzen therapiert: Chirurgie, Chemotherapie, Radiotherapie und Immuntherapie. In der Chemotherapie eingesetzte Zytostatika besitzen leider vielfältige unerwünschte Wirkungen auf das gesunde umgebende Gewebe und beeinträchtigen vor allem schnell wachsende Organe wie das Knochenmark und die Schleimhäute. Auf der anderen Seite zeigen sich viele Tumore primär resistent gegenüber konventionellen Zytostatika oder entwickeln sekundär Chemoresistenz in Folge vorangehender zytostatischer Behandlungen. In der Krebsforschung werden deswegen neue, gezieltere und effektivere Substanzen gesucht.

Ein Kandidat ist TRAIL (*tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand*), das als neues potentielles Tumortherapeutikum gilt, da es selektiv Tumorzellen zum Zelltod führt und normale Körperzellen nicht beeinträchtigt (Fulda und Debatin, 2004). TRAIL befindet sich zur Zeit in klinischen Phase I und II Testungen. Allerdings machte die Arbeitsgruppe, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, eine unerwartete Beobachtung, die die Grundlage für meine Arbeit darstellt: TRAIL besitzt in gewissen Tumorzellen eine unerwünschte Wirkung, die gegen die Zelltod-Funktion arbeitet, denn TRAIL verlängert das Überleben der Tumorzellen und induziert sogar vermehrt Proliferation in Apoptose-resistenten Tumorzellen (Ehrhardt *et al.*, 2003; Baader *et al.*, 2005; s. Abb. 1). Diese Beobachtung war unerwartet, denn es war davor nicht bekannt, dass ein und dieselbe Substanz sowohl Zelltod, als auch Zellüberleben in Tumorzellen auslösen kann. Umgekehrt könnte diese Beobachtung bedeuten, dass Patienten mit Apoptose-resistenten Tumoren von einer Therapie mit TRAIL ausgeschlossen werden sollten, damit TRAIL keine unerwünschte Wirkung auf das Tumorwachstum auslösen kann. Dabei ist bis heute ungeklärt, ob diese doppelte und gegensätzliche Wirkung auf TRAIL beschränkt ist oder noch weitere Apoptose-induzierende Substanzen umfasst. Somit ist es überaus wichtig, diese neue Funktion

von Apoptose-induzierenden Substanzen besser zu verstehen und zu untersuchen, ob sie auf TRAIL beschränkt ist. Deswegen war es meine Aufgabe, die Induktion von Überleben und Proliferation durch TRAIL und andere zytostatische Substanzen auf Tumorzellen näher zu charakterisieren.

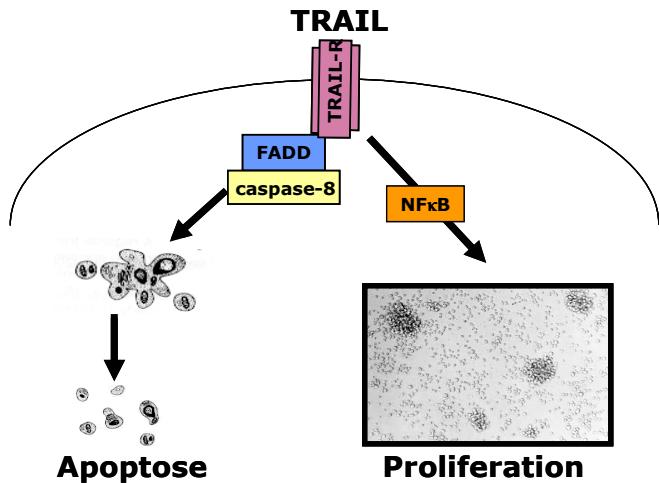


Abb. 1. Entgegengesetzte Wirkungen. TRAIL induziert Apoptose und Proliferation in Tumorzellen.

3.2 TRAIL

3.2.1 Trail als mögliches Tumortherapeutikum

Die Todesliganden, CD95, TNF α und TRAIL, gelten als potentielle Tumortherapeutika, da sie in diversen Tumorzellen selektiv und p53 unabhängig Apoptose induzieren (Wang und El Deiry, 2003). Die meisten Chemotherapeutika, die heute in der Tumortherapie 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 fein regulierter physiologischer Mechanismus, der nach einem festem Schema verläuft und deshalb auch durch den Begriff „programmierter Zelltod“ geprägt wird. Todesliganden können möglicherweise gegenüber Chemo- und Radiotherapie-resistanten Tumorzellen eingesetzt werden. Trotz potentieller Vorteile wurden klinische Studien mit TNF α - und CD95-Ligand aufgrund der hohen Toxizität bisher verunmöglich (Walczak und Krammer, 2000). Während TNF α bei systemischer Gabe eine potentiell letale Entzündungsreaktionen

hervorruft (Tartaglia *et al.*, 1992), führt CD95L zu massiver Apoptoseinduktion gesunder Hepatozyten gefolgt vom Leberversagen (Ogasawara *et al.*, 1993).

TRAIL in seiner rekombinanten und löslichen Form ist in der Lage in unterschiedlichen Tumorzelllinien wie z.B. Colon-Carcinom, Mamma-Carcinom, maligne Hirntumoren, Ewing-Sarkom, Neuroblastom, Osteosarkom, Leukämie und Lymphome Zelltod zu induzieren (LeBlanc und Ashkenazi, 2003; Kaufmann und Steensma, 2005; Wajant *et al.*, 2002). In-vivo- Studien an unterschiedlichen Tumorarten zeigen, dass TRAIL zu vermindertem Wachstum und Tumorregression führt (Walczak *et al.*, 1999, Fischer und Schulze-Osthoff, 2005). TRAIL in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verstärkt deren zytotoxische Wirkung (Wen *et al.*, 2000; Nagane *et al.*, 2000). Anders als CD95-Ligand und TNF α ist im Fall von TRAIL tierexperimentell und am Menschen kaum toxische Wirkung auf normale Körperzellen, nicht- Tumorzellen, beobachtet (Ashkenazi *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2001; Buchsbaum *et al.*, 2006). Durch seinen toxischen Effekt selektiv auf Tumorzellen wird TRAIL im Moment intensiv als potentielles Tumortherapeutikum untersucht (Fulda und Debatin, 2004). Damit TRAIL klinisch eingesetzt werden kann, darf es keine starke toxische Wirkung auf normale, gesunde Körperzellen aufweisen. Wenige Studien berichten von Nebenwirkung auf Leber- und Hirngewebe (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). Im Großen und Ganzen zeichnet sich TRAIL, insbesondere in seiner nativen ungekoppelten Form, durch wenig Toxizität aus und gilt als ein vielversprechendes neues Therapeutikum, das in zahlreichen Tumorzelllinien in vitro sowie in Tumor Xenografts in vivo potent Apoptose induziert. In der klinischen Forschung befinden sich derzeit ebenso agonistische Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren (U.Fischer und K. Schulze-Osthoff, 2005).

3.2.2 Allgemeines zu TRAIL

Tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand, TRAIL (Apo2L), wurde in den Jahren 1995 und 1996 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen entdeckt und erhielt aufgrund seiner Homologie zu Vertreter der Tumornekrose-Familie TNF α und CD95 seine Bezeichnung (Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996). TRAIL ist, wie die meisten Mitglieder der TNF-Familie, ein Typ II-Transmembranprotein mit einem extrazellulär gelegenem C-Terminus und einem intrazellulär gelegenem N-Terminus (Liabakk *et al.*, 2002). Seine extrazelluläre Domäne wird durch Metalloproteasen abgespalten zum löslichen Ligand (Mariani und Krammer, 1998). Wie die meisten TNF-Familienmitglieder liegt TRAIL als Homotrimer vor (Hymowitz *et al.*, 1999). An jeder Untereinheit des trimeren Proteins ist ein Zink-Ion gebunden, welches entscheidend zur Stabilität des Liganden beiträgt (Bodmer *et al.*, 2000; Bouralexis *et al.*, 2005). TRAIL bindet an fünf Rezeptoren, die bisher beschrieben sind. Über die beiden agonistischen Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) induziert TRAIL Apoptose (Chaudhary *et al.*, MacFarlane *et al.*, Pan *et al.*, Walczak *et al.*, Wu *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu kann nach Bindung von TRAIL an seine antagonistischen Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 - TRAIL-R5 keine Apoptose eingeleitet werden (Degli-Esposti *et al.*, 1997; Marsters *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997, 1998). Dies ist dadurch bedingt, dass TRAIL-R3 und TRAIL-R4 keine funktionstüchtigen sogenannte Todesdomänen (death domain = DD) enthalten (Almasan und Ashkenazi, 2003). Es wird vermutet, dass Rezeptoren ohne zelltodauslösende Funktion als sogenannte „Decoy“ Rezeptoren wirken und mit den Apoptose-induzierenden 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). TRAIL wird von unterschiedlichen menschlichen Gewebeformen und Zelllinien konstitutiv exprimiert (Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996), am häufigsten von den Zellen des Immunsystems (Hayakawa *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2005, Smyth *et al.*, 2003). Die physiologische Funktion von TRAIL ist noch nicht hinreichend erforscht. TRAIL scheint an immunologischen Prozessen (Lamhamdi-Cherradi *et al.*, 2003)

sowie bei der Tumorenstehung und –progression (Cretney *et al.*, 2002; Smyth *et al.*, 2001; Takeda *et al.* 2001) beteiligt zu sein.

3.2.3 TRAIL und nicht- / anti-apoptotische Funktionen

TRAIL wird zur Zeit in Phase I und II Studien an Krebspatienten ausgetestet mit dem Ziel, dass TRAIL Zelltod in den Tumorzellen der Patienten induziert. Leider weisen viele Tumorzellen jedoch eine Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose auf, welche entweder von Anfang besteht oder im Verlauf der Therapie entsteht.

Eine Reihe von Mechanismen der TRAIL-Resistenz sind beschrieben, darunter: Der Verlust von agonistischen TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und –R2 kann zur Resistenz führen (Arai *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999, 2001; Pai *et al.*, 1998). Sehr viele Tumorzelllinien weisen eine TRAIL-Resistenz auf, die korreliert mit herunter regulierter oder fehlender Caspase-8-Expression. Eine Wiederherstellung der Expression von Caspase-8 sensitiviert resistente Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose (Eggert *et al.*, 2001; Fulda *et al.*, 2001b; Ehrhardt *et al.*, 2003; Ehrhardt *et al.*, 2007).

Zunächst dachte man, dass TRAIL auf Tumorzellen mit Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose keine Wirkung hätte. In den letzten Jahren mehren sich jedoch Berichte, dass TRAIL auf Apoptose-resistente Tumorzellen andere, entgegengesetzte Funktionen ausübt. An dieser Stelle werden nicht- bzw. antiapoptotische Funktionen von TRAIL dargelegt:

TRAIL fördert die Proliferation von Endothelzellen über eine Aktivierung des ERK-Signalweges (Secchiero *et al.*, 2003). Die TRAIL-induzierte ERK-Aktivierung ist allgemein mit anti-apoptotischer Funktion assoziiert, was durch zahlreiche Studien belegt ist (Soderstrom *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2001). Im selben sowie in einem weiteren Zellsystem wird die protektive Wirkung von ERK vor Apoptose beschrieben (Zhang *et al.*, 2003).

Ishimura *et al.* beschreiben eine wichtige Rolle von TRAIL bei der Tumormetastasierung und Invasion. Dies erfolgt durch eine Aktivierung des NFkB-Signalweges (2006). Die Förderung der Metastasierung wurde auch bereits tierexperimentell nachgewiesen (Trauzold *et al.*, 2006).

Einige Arbeiten untersuchen eine Rolle von TRAIL bei der Regulation der Hämatopoiese (Zamai *et al.*, 2000; Secchiero *et al.*, 2004), bei der Reifung von bestimmten T-Zellen (Hayakawa *et al.*, 2004) sowie bei der Inflammation (Leverkus *et al.*, 2003).

3.2.3.1 TRAIL und NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert viele physiologische Prozesse wie angeborene und erworbene Immunantwort, Zelltod, Proliferation und Inflammation (Karin *et al.*, 2002; Ravi and Bedi 2004). NF-κB ist an der Aktivierung von über 200 Genen beteiligt und kann je nach biologischem Kontext unterschiedlich wirken, pro- oder antiapoptotisch. Die phylogenetisch hoch konservierte NF-κB-Familie umfasst mehr als zehn Mitglieder, die durch Dimerisierung dieser fünf Proteine entstehen: cRel, RelA (p65), RelB, p50 und p52 (Perkins, 2007).

Es gibt mehrere unterschiedliche Aktivierungswege von NF-κB: Der am häufigsten beobachtete ist der klassische oder auch kanonische Weg genannt. Der klassische Weg der NF-κB-Aktivierung wird hauptsächlich durch proinflammatorische Stimuli oder genotoxischen Stress ausgelöst. NF-κB findet sich im nicht-stimulierten Zustand im Zytoplasma an seinen Inhibitor, IκB α , gebunden, vor. Nach Bindung eines Stimulus z. B. TRAIL am Rezeptor kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch spezifische Phosphorylierung. Anschließend phosphoryliert ein Teil dieses Kinasen-Komplexes, IκB α , den Inhibitor von NF-κB. IκB α wird polyubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Als Folge dessen wird die NLS (*nuclear localisation sequence*) von NF-κB demaskiert und der Transkriptionsfaktor in den Zellkern transloziert, wo er die Transkription seiner Zielgene reguliert. Dazu gehört auch IκB α , welches nach Neusynthese in den Kern wandert, NF-κB von der DNA ablöst und zurück ins Zytoplasma transportiert. Durch diese negative Rückkopplung reguliert NF-κB seine eigene Aktivität (Hoffmann *et al.*, 2006). Der alternative NF-κB-Aktivierungsweg wird durch diverse Mitglieder der TNF-Familie stimuliert und ist ebenfalls in Abb. 2 dargestellt.

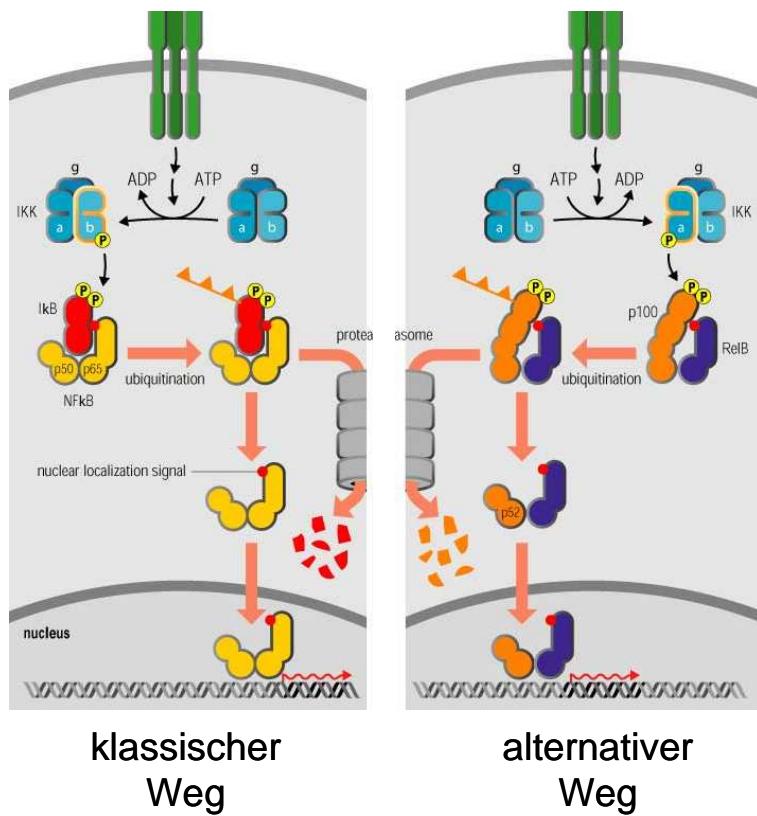


Abb. 2. Der klassische und alternative NF-κB-Signalweg. Zwei Signalwege führen zur Aktivierung von NF-κB. Nach Stimulation des klassischen Signalweges kommt es zu IKK-abhängigen Phosphorylierung und nachfolgender Polyubiquitinierung der IκB-Proteine, die in einer proteasomalen Degradation endet. Dadurch wird das NF-κB-Dimer freigesetzt und transloziert in den Kern, wo es die Transkription von Zielgenen aktiviert. Im alternativen Weg erfolgt IKK-abhängig die proteasomale Degradation von p100 zu p52. Dies führt zu einer Translokation eines p52/RelB-Dimers in den Kern.

NF-κB fördert unter anderem die Expression zahlreicher Gene, die antiapoptotische oder proliferationsfördernde Proteine kodieren, wie FLIP (Kreuz et al, 2001), einige Mitglieder der IAP Familie (Ravi et al, 2001; Chen et al, 2003) und Bcl-xL (Chen et al, 2000). TRAIL selbst aktiviert nach Bindung an den Rezeptor über das Adaptermolekül RIP NF-κB (Lin et al., 2000, Di Pietro und Zauli, 2004) und schützt die Zellen über eine vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine vor der Apoptoseinduktion. Wird die NF-κB-Signalkette unterbrochen durch z.B. dominant Transfektion des Inhibitors von NF-κB, IκBα, werden die Tumorzellen für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert (Jeremias et al., 1998).

3.2.4 Definition der Gruppen P, AP, A und 0

Zur Charakterisierung der verschiedenen Wirkungen von TRAIL auf Tumorzellen wurde in der Arbeitsgruppe eine neue Klassifikation eingeführt (Baader *et al.*, 2005). In die Gruppe A fallen solche Zelllinien, die nach Stimulation mit TRAIL Apoptose zeigen, in Gruppe P solche, die nach Stimulation mit TRAIL Proliferation oder Überleben zeigen. In Gruppe 0 befinden sich Tumorzellen, die nicht mit einem messbaren Effekt auf TRAIL-Stimulation reagieren. In Gruppe AP finden sich Zellen, die auf niedrige Konzentrationen von TRAIL und nach kurzen Inkubationszeiten Proliferation zeigen. Wird die Konzentration von TRAIL jedoch erhöht und / oder die Inkubationszeit verlängert, so sterben die Zellen nach Stimulation von TRAIL ab. Das Vorhandensein von Gruppe AP Tumorzellen zeigt, dass beide Signalwege in ein und derselben Tumorzellen vorhanden und durch TRAIL aktivierbar sein können.

3.3 ZYTOSTATIKA

3.3.1 Allgemeines zu Zytostatika

Während verschiedene Forschungsgruppen gezeigt haben, dass TRAIL, obwohl mit dem Ziel der Apoptose-Induktion gegeben, gegenteilige, anti-apoptotische Funktionen auf Tumorzellen auslösen kann, ist bis heute völlig unklar, ob anti-apoptotische Effekte auf Tumorzellen allein durch TRAIL ausgelöst werden können oder auch durch andere pro-apoptotische Substanzen. Bei TRAIL handelt es sich um ein Zytostatikum in früher klinischer Testung - klinisch relevanter sind jedoch zytostatische Substanzen, die heute täglich in der Klinik eingesetzt werden. Deswegen wurden klinisch eingesetzte Zytostatika in meine Untersuchungen einbezogen mit der Fragestellung, ob auch klinisch eingesetzte Zytostatika Proliferation auf Tumorzellen auslösen können.

Zytostatika bilden eine chemisch heterogene Gruppe pharmakologisch zytotoxischer Substanzen, die die Zellteilung proliferierender Zellen durch unterschiedliche Beeinflussung ihres Stoffwechsels verhindern oder erheblich verzögern (Tab. 1).

Der Einsatz von Zytostatika ist auf empirische Studien zurückzuführen. Die ersten Zytostatika waren Stoffe, die dem Militär als chemische Waffen dienten. Zu Beginn

der 40er Jahre führten Goodman und Gilman, angehalten durch das amerikanische Verteidigungsministerium, erstmalig tierexperimentelle Versuche mit Stickstofflost durch, um den therapeutischen Wert des Kampfgases zu testen. Die beiden Pharmakologen von der Universität Yale beobachteten eine Remission bei der Behandlung eines Non-Hodgkin-Lymphomes und führten so den Einsatz von systemisch wirksamen Zytostatika in die klinische Praxis ein (Gilman *et al.*, 1946; Gilman *et al.*, 1963). Die Kenntnisse über genaue Wirkungsweisen von den meisten Zytostatika, die in den gängigen Therapieprotokollen verwendet werden, sind bis heute nicht vorhanden. Die Tatsache, dass sie Tumorzellen töten und damit zur Reduktion von Tumormassen oder gar zur Krankheitsheilung beitragen können, war und ist ein berechtigter Grund, sie einzusetzen (Chabner und Roberts Jr, 2005). Bekannt ist, dass die meisten Chemotherapeutika, die heute in der Tumortherapie eingesetzt werden, zum apoptotischen Zelltod führen. (Kaufmann *et al.*, 2000, Herr *et al.*, 2001). In den letzten 20 Jahren ging mit dem besseren Verständnis molekularer Vorgänge bei der Entstehung von malignen Zellen vermehrt die Entwicklung von Medikamenten einher, die gezielt (*'targeted therapy'*) die Tumorzellen bekämpfen (Sawyers *et al.*, 2004).

Die Entwicklung und Prüfung neuer Therapieformen ist ein gesetzlich streng geregelter Prozess. Dabei sind die Wissenschaftler stets dem Wohl des Patienten verpflichtet (Helsinki-Deklaration, 1964). Die Pharmakokinetik sowie Toxizität einer neuen Substanz werden zunächst in der Zellkultur, dann im Tierversuch und erst bei guter Wirksamkeit und wenig unerwünschter Wirkungen im Tierversuch auf den Menschen in mehreren Phasen getestet. Bereits im klinischen Einsatz befindliche wirksame Zytostatika werden in sogenannten Therapieoptimierungsstudien untersucht. Die Therapieoptimierungsstudien sind von besonderer Wichtigkeit in der Onkologie. Hier sollen schon wirksame Verfahren weiter verbessert werden, etwa durch eine neue Kombination von Medikamenten oder das Reduzieren von Therapieschritten, die mit vielen Nebenwirkungen verbunden sein können. Die systemische Prüfung der Arzneimittel erfolgt unter neuen Bedingungen wie z.B. unter nicht zugelassener Indikation oder mit nicht zugelassenen Dosierungen (dkfz.de). Insgesamt werden sowohl bei der Entwicklung von Therapieformen und bei der Durchführung der Therapie standardisierte Vorgehensweisen etabliert.

3.3.2 Zytostatika- Einteilung

Zytostatika werden im Allgemeinen nach ihrer Wirkstoffgruppe eingeteilt (Tab.1). Gemeinsam haben sie die Eigenschaft, dass sie in schnell proliferierenden Zellen Apoptose induzieren. Dies ist ein wesentliches Charakteristikum für maligne transformierte Zellen.

Tab. 1. Übersicht: Zytostatika und andere antineoplastisch-wirksame Pharmaka. (angelehnt an die WHO-Einteilung) Die Substanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden sind hervorgehoben (dick gedruckt). Unter Anwendung sind auch nur diese aufgelistet, wobei die Leukämie-relevanten Pharmaka in blauer Farbe hervorgehoben sind.

Klassen	Wirkstofftyp	Freiname	Anwendung
1.Alkylantien	- Alkylsulfonate - Ethylenimine - Nitroseharsstoff-verbindungen - Stickstofflost-derivate	Busulfan Thiotepa Carmustin Lomustin Cyclophosphamid Ifosfamid Chlorambucil Melphalan	<u>Carmustin:</u> M. Hodgkin,NHL, Plasmozytom,primäre Hirntumoren <u>Cyclophosphamid:</u> Leukämien,Hodgkin- Lymphome u.NHL, Plasmozytom
2.Antimetaboliten	- Folsäureanaloga - Pyrimidinanaloga - Purinanaloga und verwandte Substanzen	Methotrexat 5-Fluorouracil (5-FU) Cytarabin (AraC) Gemcitabin 6-Mercaptopurin 6-Thioguanin(6-TG), Azathioprin Pentostatin	<u>Methotrexat:</u> ALL,Osteosarkom <u>5-FU:</u> Mamm-, Colon-, Magen- ,Pancreas-, Ovarcarcinom <u>AraC:</u> ALL, AML <u>6-TG:</u> ALL, AML
3.Pflazenalkaloide	- Podophyllinderivat - Taxane - Vincaalkaloide	Etoposid Paclitaxel Vincristin Vinblastin Vindesin	<u>Etoposid:</u> Hodgkin,NHL,AML,Bronchial- Ca <u>Paclitaxel:</u> Mamm-, Ovar-, Bronchial- Ca <u>Vincristin:</u> Hodgkin, NHL,AML
4.Antibiotika	- Anthrazykline - sonstige zytostat. AB	Daunorubicin Doxorubicin Epirubicin Idarubicin Mitoxantron Belomycin Actinomycin D (=Dactinomycin)	<u>Epirubicin:</u> Mamm-, Bronchial-Ca, Hodgkin, pädiatrische Weichteilsarkome <u>Act D:</u> Wilms-Tumor, Rhabdomyosarkom
5.sonstige Zytostatika	- Platin-Verbindungen	Carboplatin Cisplatin	<u>Cisplatin:</u> Bronchial-, Hoden-Ovar-

	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Camptothecin-Derivate</i> -<i>sonstige</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Irinotecan Topotecan Amsacarin Dacarbazin 	<p>Ca <u>Topotecan:</u> Ovar <u>Dacarbazin:</u> Malignes Melanom, Hodgkin, Weichteilsarkome</p>
6.Signaltransduktions-inhibitoren	<i>Imitinab</i> <i>Geftinib</i>		
7.Monoklonale Antikörper	<i>Rituxinmab</i> <i>Trastuzumab</i> <i>Cetuximab</i>		
8.Hormone	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Östrogene</i> -<i>Antiöstrogene</i> -<i>Andogene</i> -<i>Glukokortikoide</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Fosferol Tamoxifen Testosteron Prednisolon Dexamethason 	<p><u>Dexamethason:</u> Leukämien</p>
9.Zytokine	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Wachstumsfaktoren</i> -<i>Interferone</i> -<i>Interleukine</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Filgrastim (G-CSF) $\alpha/\beta/\gamma$- Interferone IL-2, IL-3 	

3.4 FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das vollkommen neue und in unserer Arbeitsgruppe erstmals beschriebene Phänomen näher zu charakterisieren: Die Proliferation von Tumorzellen durch Apoptose-auslösende Substanzen.

Dabei wurden in einem ersten Teil die in Phase I und II-Studien eingesetzte Substanz TRAIL verwendet und nach dem intrazellulären Signalweg der Proliferation und speziell die Rolle von NF- κ B in diesem Signalweg gefragt. Zu diesem Zweck wurde eine spezifische molekulare Inhibition des NF- κ B-Signals eingesetzt.

In einem zweiten Teil wurde gefragt, wie häufig Zytostatika-induzierte Proliferation auf Tumorzellen verschiedener Tumortypen und auf primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie nachgewiesen werden kann.

Zusammengekommen sollten die während der Arbeit erhobenen Daten beitragen, Proliferation als neue, gegen die Tumorzellen gerichtete Nebenwirkung der Zytostatika besser zu verstehen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MATERIAL

4.1.1 Antikörper

Antikörper	Bezogen von	Verdünnung	Spezies	Verdünnung 2. AK
IkB α	Santa Cruz	1: 5000 in TBST	rabbit	1: 10 000
phospho-IkB α	Cell signaling	1: 1000 in Roti- Block	rabbit	1: 5000
NFkB p-65	Santa Cruz	1: 1000 in Roti- Block	rabbit	1: 5000
Histon H1	Santa Cruz	1: 1000 in TBST	rabbit	1: 5000
α -tubulin	Calbiochem	1: 5000	mouse	1: 5000
2. AK rabbit	Pierce		goat	
2. AK mouse	Pierce		goat	

4.1.2 Chemikalien

Trypsin	PAN TM Biotech GmbH (Aidenbach, D)
Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe, D)
APS	Biomol (Hamburg, D)
BSA	Sigma (Steinheim, D)
DMSO	Sigma
FCS	Invitrogen (San Diego, USA)
Gentamycin	Biochrom AG (Berlin, D)
Glutamin	Fa. Gibco f. Invitrogen (San Diego, USA)
Isopropanol	Roth
Milchpulver	Roth
Penicillin/ Streptomycin	Fa. Gibco f. Invitrogen
Propidiumiodid	Sigma
Roti- Block	Roth
SDS	ICN Biomedicals (Meckenheim, Germany)

TEMED	Roth
TRIS	Roth
Tween 20	Sigma

4.1.3 Geräte

Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell	Biorad (Krefeld, D)
Cellscreen	Innovatis (Bielefeld, D)
Durchflusszytometer	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Elektrophoresekammern	Biorad
Eppendorfpipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Filmentwicklungsmaschine CP 1000	Agfa (Köln, D)
Lichtmikroskop Telaval 31	Zeiss (Jena, D)
Zentrifugen	Eppendorf

4.1.4 Proteinaseinhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Phosphataseinhibitor	Sigma
(Na-ortho-vanadat)	

4.1.5 Puffer, Medien und andere Lösungen

Gelpuffer:

Puffer A:	36.3 g TRIS (3M), 48 mL 1M HCl, mit Aqua dest. ad 100 mL, pH = 8.9
Puffer B:	5.7 g TRIS (0.47M), 25.6 mL 1M Phosphorsäure, mit Aqua dest. ad 100 mL, pH = 6.7

Kernlysepuffer:

Puffer Kern A	1 mL 1M Hepes, 100 µL 1M KCl, 150 µL 1M MgCl ₂ ,
---------------	---

500 µL TritonX 100, mit Aqua dest. ad 100 mL,
pH = 7.0 mit KOH eingestellt

Puffer Kern B 2 mL 1M Hepes, 40 mL 1M KCl, 20 mL 0.5M EDTA,
25 mL Glycerin (100%), 13 mL Aqua dest.
pH = 7.9 mit KOH eingestellt

Lysepuffer:

Zytosolischer Lyse-Puffer 62.5 mM TRIS-HCl (pH = 6.8), 2% SDS, 10%
(1x SDS Sample Buffer, Glycerin, 0.01%
Bromphenolblau cell signaling)

Ladepuffer:

5x Ladepuffer 12.5 mL 1M Tris (pH 6.8), 25 mL SDS 20%,
25 mL Glycerol 100%, 12.5 mL Aqua ad injectionem

5x Ladepuffer 30 mL einer 1% TRIS (pH = 6.8), 5 g SDS, 60 g
(für Kernlysate) Glycerol, 0.05 g Coomassie blau

Laufpuffer 5x 37.75 g Tris Base, 235 g Glycin,
(2.5 L) 125 ml SDS (10%)

Transferpuffer 15 g Tris, 71 g Glycin, 790 g Methanol, gereinigtes
Wasser ad. 5 L

10x TBS 48.4 g TRIS, 60 g NaCl, Aqua dest. ad 2 L, pH = 6.8

10x PBS 29.2 g Na₂HPO₄ 2H₂O, 4 g KH₂PO₄, 160 g NaCl,
4 g KCl, H₂O dd. ad 2 L

Medien

RPMI 16 40,	Gibco f. Invitrogen, (San Diego, USA)
DMEM,	Gibco f. Invitrogen
F 12,	Gibco f. Invitrogen
Opti MEM®	Gibco f. Invitrogen

4.1.6 Stimulantien

Zytostatika

Act D	Sigma (Deisenhofen, D)
Ara C	Sigma
BCNU	Sigma
Cisplatin	Alexis Corp.(Lausanne, Schweiz)
Cyclophosphamid	Baxter Oncology GmbH (Frankfurt, D)
Dacarbacin	Sigma
Epirubicin	Hexal (Holzkirchen, D)
Etoposid	Sigma
5-FU	Sigma
Methotraxat	Calbiochem (San Diego, USA)
Paclitaxel	Calbiochem
Topotecan	GlaxoSmithKline (München, D)
Vincristin	Calbiochem

Sonstige Stimulantien:

Dexamethason	Sigma
TNF α	Bio Vision
TRAIL	Pepro Tech. (Rocky Hill, USA)
γ -Strahlung	Cäsium 137, GammaCell (Kanada)

4.1.7 Software

Cell Quest	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
------------	--------------------------------------

Excel	Microsoft
SigmaStat	Blue Stallion Tech. (Johannesburg, Südafrika)
Reference Manager 11.0	ISI Research Soft

4.1.8 Sonstiges

Cryotubes	Nunc (Wiesbaden, D)
Gene Juice®	Novagen f. EMD (San Diego, USA)
Kollagenbeschichtete Flaschen	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (Burlington, USA)
PVDF- Membran	Millipore (Bedford, USA)
Whatmann-Papier	Biorad (München, Germany)
Zellkulturflaschen	Nunc (Wiesbaden, D)

4.1.9 Vektoren

Vektoren	Konstrukt
pRC-Vektor	leer
(1 µg/mL)	
pRC-Vektor	Wild Typ
pcDNA 3.1	GFP
(500 ng/mL)	

4.1.10 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und ihre Kulturbedingungen sind im Folgenden aufgeführt:

Bezeichnung	Zelltyp	Morphologie	Kulturmedium	P*
KELLY	Neuroblastom	Adhärent	RPMI mit 10-20% FCS	1:3
CADO	Ewing Sarkom	Adhärent	RPMI mit 10% FCS	1:5
MCF-7	Mammakarzinom	Adhärent	RPMI mit 10% FCS	1:5
JURKAT	T-Zell	Schwimmend	RPMI mit 10% FCS	1:5

	Leukämiezellen				
RH 30	Rhabdomyosarkom	Adhärent	RPMI mit 10% FCS	1:5	
SAOS-2	Osteosarkom	Adhärent	DMEM, F12 (jeweils 50%), mit 10% FCS	1:3	
MDA-MB	Mammakarzinom	Adhärent	DMEM mit 10% FCS	1:10	
U 373	Glioblastom	Adhärent	RPMI mit 10% FCS	1:10	

*P = Verdünnungsverhältnis beim Passagieren (alle 3 Tage)

Primäre leukämische Zellen:

Unser Labor erhält seit vielen Jahren primäre Zellen von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämien, die in der Dr. von Haunerschen Klinik behandelt werden. Dies ermöglicht uns, die in-vitro durchgeführten Experimente auch in-vivo durchzuführen und damit die klinische Relevanz zu überprüfen. Da bei Kindern nur geringe Probenmengen entnommen werden, wurde in unserem Labor ein Tumor-Xenograft-Modell etabliert. Hier konnte aus der Milz der Mäuse bis zu 5×10^8 primäre Zellen isoliert werden, die dann zur Testung herangezogen wurden. Die Isolatierung von Lymphozyten aus dem Patientenblut erfolgte mittels Ficoll Isopaque-Dichterradientenzentrifugation. Die Zellen wurden in 20% FCS- haltigem RPMI-Medium ausgesät und mit einer Reihe von in der Leukämie-Therapie relevanten Zytostatika stimuliert.

4.2 METHODEN

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Passagieren, Einfrieren, Auftauen

Die aufgeführten Zelllinien wurden in mittleren Kulturflaschen (75 cm^2) in den angegebenen Medien bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Adhärent wachsende Zellen sowie Suspensionszellen wurden alle 3 Tage passagiert (Verdünnung s. Tab.2). Das Ablösen der adhärenen Zellen erfolgte durch Behandlung mit Trypsin-EDTA.

Um Zellen einzufrieren, wurden diese in einer Konzentration von mind. 10^6 Zellen/mL in FCS und 10% DMSO resuspendiert und eingefroren. Die Lagerung erfolgte max. 2 Monate bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff.

Eingefrorene Zellen, die wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit 8 mL Kulturmedium versetzt.

Die Zellen wurden für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert, in 1 mL FCS resuspendiert und in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm²) überführt, welche anschließend auf 10 mL mit Kulturmedium aufgefüllt wurde. Hierbei wurden dem Medium einmalig Penicillin/Streptomycin (1%) zugesetzt.

4.2.1.2 Stimulationsexperimente

Zellen wurden je nach Größe in unterschiedlicher Zahl (CADO mit 1.4×10^4 , KELLY mit 1×10^4 und MCF-7 mit 5×10^3 Zellen in 100 µL pro Well einer 96-Well-Platte) ausgesät, um eine Zellbedeckung vor Stimulation von ca. 10% zu erreichen. Während adhärent wachsende Zellen nach etwa 24 Stunden stimuliert wurden, konnte das bei Suspensionszellen direkt nach dem Aussäen (10^5 Zellen in 100 µL) durchgeführt werden.

Im Vorfeld wurde das Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von FCS im Kulturmedium untersucht. Da es sich bereits früher gezeigt hatte, dass Zytostatika-induzierte Proliferation häufig vom Spontanwachstum der Zellen abhängt, wurde der hierfür günstige FCS-Gehalt im Medium gewählt. Das Medium der MCF-7-Zellen enthielt kein FCS, das der CADO-Zellen 0.5% FCS und das der KELLY-Zellen 10% FCS.

Bei adhärenten Zelllinien wurde 30 Minuten vor der Stimulation das verbrauchte Medium entfernt, 200µL frisches Medium zugegeben und die Platte wieder bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Zytostatika wurden so in PBS verdünnt, dass später eine Endkonzentration erreicht wurde, die der jeweiligen Plasma-Spitzen-Konzentration, sowie Konzentrationen, die drei bis vier Zehnerpotenzen darunter liegen, entspricht (s. Tab. 2). Wenn eine bereits unter der Plasma-Spitzen-Konzentration liegende Konzentration auf die Zellen hochgradig toxisch wirkt, wurde diese als höchste Konzentration verwendet. Die Zytostatikaverdünnungen wurden 1:100 vorbereitet. Es wurden wegen der hohen Intraassayvarianz Vierfachbestimmungen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit 2 µL des Lösungsmittels des jeweiligen

Zytostatikums behandelt. Suspensionszellen wurden direkt nach dem Aussäen mit 1 µL pro 100 µL der jeweiligen Zytostatikaverdünnungen stimuliert.

Tab. 2. Übersicht über verwendete Zytostatika bzw. Bestrahlung und ihre Dosierungen

Zytostatikum	Plasma-Spitzen-Konzentration	Referenz zu PSK	Dosierung im Experiment
Actinomycin D	25.1 ng/mL	Veal GJ <i>et al.</i> , 2005	25/10/1/0.1 ng/mL
Cytarabin (AraC)	5-20 µM	Estlin <i>et al.</i> , 2001	1/0.1/0.01/0.001 µM
BCNU	2 µg/mL	Skalski, V. <i>et al.</i> , 1988	2/0.2/0.02/0.001 µg/mL
Cisplatin	2 µg/mL	Verwendet in Jeremias, <i>et.al.</i> , 2004	2/0.2/0.02/0.002 µg/mL
Cyclophosphamid	0.18-1.1 µM	Hassan <i>et al.</i> , 1999	1/0.1/0.01/0.001 µM
Dacarbacin	(27 µM)	Verwendet in Baader <i>et al.</i> , 2005	5/0.5/0.05/0.005 µM
Epirubicin	0.45-1.8 µg/mL	G. Lunardi <i>et al.</i> , 2003	2/0.2/0.02/0.002/0.0002 µg/mL
Etoposid (VP16)	13.1-54.2 µM	Lowis <i>et al.</i> , 1993	30/.../0.001 µM
5-FU	0.44-5.46 µM	S. Urien <i>et al.</i> , 2003	1/0.1/0.01/0.001/0.0001 µM
Methotrexat	5.4-33.7 µM	Evans <i>et al.</i> , 1983	30/3/0.3/0.03/0.003 µM
Paclitaxel	0.2 µM-23.4 µM (20 µg/mL)	K. Mross <i>et al.</i> , 2000	20/2/0.2/0.02/0.002/0.0002 µg/mL
Topotecan	0.2-20 ng/mL (43.7 nM)	B.W. Cooper, <i>et al.</i> , 2003	0.02/0.002/0.0002 µM
6-TG	0.52±0.72 µM	E.C. Lowe <i>et al.</i> , 2001	1/0.1/0.01/0.001 µM
Vincristin	99-370 ng/mL	Estlin <i>et al.</i> , 2000	300/30/3/0.3/0.03/0.003 ng/mL
γ-Strahlung	60 Gray	Klinisch eingesetzte Maximaldosis	5/0.5/0.05 Gray
Dexamethason	0.65-1.01 µM	Charles <i>et al.</i> , 1993	10/1/0.1/0.01/0.001 µM

4.2.2 Proliferationsmessung durch Cellscreen

Das Cellscreen-System ist ein Computer-gesteuertes Invers-Mikroskop mit einer integrierten Fotokamera, das die gleichen Zellen an verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Der angeschlossene Computer ermöglicht eine Zellzahlbestimmung

der photographierten Zellen über die Bestimmung der mit Zellen bedeckten Fläche (Abb. 3).

Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein inverses Mikroskop, das ein 10x- bzw. ein 4x- Objektiv, eine CCD- Kamera (1024x1024 Pixel), einen motorisierten Mikrotiter-Plattentisch, verschiedene Softwaremodule (je nach Applikation) und einen Hochleistungsspeicher/-prozessor umfasst.

Die Oberflächenbedeckung der 96-Well-Platten wurde direkt im Anschluss an die Stimulation am Cellscreen gemessen (Wert bei 0 h). Die adhärenten Zellen wurden im AC- Modul und mit dem 4x Objektiv gemessen, die Suspensionszellen im PS- Modul und mit dem 10x Objektiv. Die zweite Messung erfolgte nach 24 Stunden und die dritte nach 48 Stunden. Die Platten wurden vor der Cellscreen-Messung mikroskopiert und mit den Bildern und Daten des Cellscreen optisch abgeglichen.

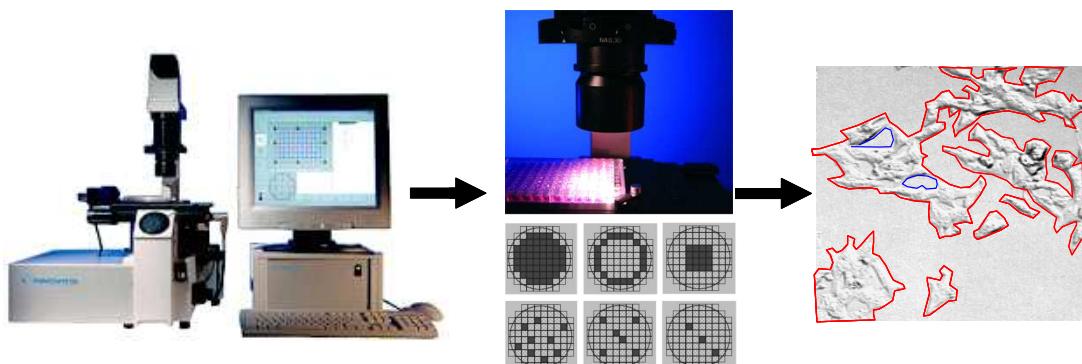


Abb. 3. Das Cellscreen misst die festgelegte Wellbedeckung in den Stimulationsexperimenten einmal direkt nach der Stimulation, dann nach 24 und 48 Stunden. Aus den erhobenen Daten lassen sich Wachstumskurven darstellen.

Kriterien für die Auswertbarkeit von Cellscreen-Versuchen:

Es wurden zwei Ausschlusskriterien zur Auswertung dieser Experimente definiert:

1. Die Oberflächenbedeckung sollte bei der ersten CS-Messung (0 h) über 8% betragen.
2. Im Zuge der Vierfachbestimmung wurden Einzelwerte, die um mehr als 20% vom Mittelwert der anderen drei abwichen, ausgeschlossen.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Sequenzierung

Jeweils 1 µg DNA von dem pRC-Vektor mit Wildtyp IκBα-Sequenz und mit einer Leer-Sequenz wurden bei 42 °C im Eppendorf-Reaktion sgefäß getrocknet und sequenziert (Fa. MWG, München). Um Abweichungen von der Originalsequenz (Punktmutationen, Deletionen und Nukleotidwahl an variablen Stellen) zu ermitteln, wurde ein Vergleich zweier Nucleotidsequenzen durch Sequenzalignement (*Tool*) durchgeführt. NCBI-Nr.: NM_020529 ("Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (NFKBIA), mRNA")

4.2.3.2 Transfektion

KELLY-Zellen wurden mit Hilfe des Transfektans Gene Guice transient transfiziert. Es handelte sich um eine Kotransfektion von einem Expressionsplasmid zusammen mit einem GFP-tragendem pRC-Vektor. Dabei wurden die Vektoren im Verhältnis 1:5 für pcDNA 3.1 (GFP): pRC-Vektor mit IκBα-Sequenz und ein Leervektor als Transfektionskontrolle eingesetzt. Das pcDNA 3.1 Plasmid, das für GFP (*green fluorescent protein*) kodierte, diente als Marker für die Transfektionseffizienz.

50 000 Zellen pro Well wurden in einer 24-Well-Platte ausgesät und etwa 36 h später das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen gemäß Gene Guice Protokoll mit (1:5 pcDNA 3.1:pRC) transfiziert. Dabei wurde zunächst pro Well 0.75 µL Gene Guice zu 20 µL Opti MEM gegeben und gut gemischt. Anschließend gab man 0.25 µg DNA dazu und inkubierte 10 Minuten lang. Dann tropfte man da Gemisch auf jedes Well. 24 h später wurde jedes Well mit 2000 ng/mL TRAIL stimuliert. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h wurden die transfizierten Zellen mikroskopisch und durchflusszytometrisch analysiert.

Auswertungskriterien:

1. Die Spontanapoptose darf bis zu 45% betragen.
2. Der Leer-Vektor dient als Transfektions-Kontrolle.
3. Die FACS-Analyse erfolgt 48h nach der Transfektion.
4. Eine Mehrfachbestimmung (6-8-fach) muss durchgeführt werden.

4.2.4 Durchflusszytometrie

Prinzip:

Das Durchflusszytometer ist ein Messgerät zur quantitativen Bestimmung von Zelleigenschaften. Eine Einzelzellsuspension, z. B. markiert mit einem spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper oder mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff wie PI, wandert durch einen Laserstrahl mit einer bestimmten Anregungswellenlänge. Die markierten Zellen emittieren Licht, das proportional ist zur Menge des gebundenen Antikörpers, bzw. Farbstoffs. Außerdem lassen Lichtstreuung und Lichtbeugung eine Aussage zur Zellgröße und Zellgranularität zu.

4.2.4.1 Apoptosemessung von primären leukämischen Zellen

Apoptotische Zellen zeichnen sich im Besonderen dadurch aus, dass ihr Zellvolumen abnimmt, die Granularität zunimmt und schließlich einzelne Zellteile als apoptotische Zellkörperchen abgeschnürt werden.

Tote lymphatische Zellen können daher durch Messung der zellulären Größe (FSC = *Forward Scatter*, Vorwärtsstreulicht) und Granularität (SSC = *Sideward Scatter*, Seitwärtsstreulicht) mittels Durchflusszytometrie (FACScan) von intakten Zellen abgegrenzt werden.

Dazu wurden jeweils 5000 Zellen gezählt und der Anteil apoptotischer Zellen in zweidimensionaler Darstellung (*Forwardside Scatter Analyse*) quantifiziert.

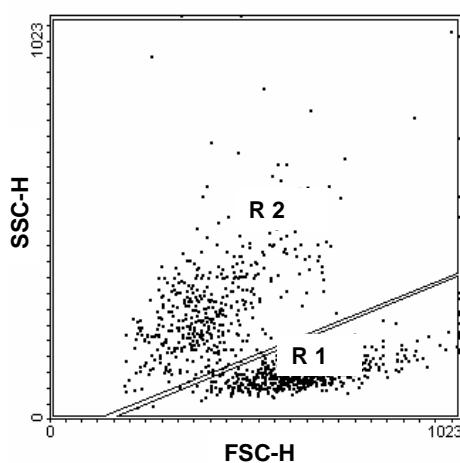


Abb. 4. Messung der Apoptoserate mittels FACscan. Exemplarisch dargestellt ist das Messergebnis einer primären leukämischen Zellprobe. Die Quantifizierung der Apoptoserate erfolgt in zwei-dimensionaler Darstellung mittels Forwardside Scatter Analyse (R1= lebende Zellen, R2 = apoptotische Zellen).

4.2.4.2 GFP/PI-Messung transfizierter Zellen

Fluoreszierende Zellen können mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht werden. Es erfasst Farbstoffe, die das gleiche Anregungsspektrum (488 nm) besitzen, jedoch unterschiedliche Emissionsspektren (GFP: 530 nm, PI: 620 nm) aufweisen. GFP-transfizierte Zellen fluoreszieren grün und lassen sich im Kanal 1 (FL1: $\lambda_{FL-1} = 530$ nm) messen. Eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) zeigt Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben. PI kann durch permeable Membranen in die Zelle diffundieren und dort an die DNA binden. Die rote Fluoreszenz von PI kann im Kanal 2 (FL2: $\lambda_{FL-2} = 585$ nm) und 3 (FL-3: $\lambda_{FL-3} = 650$ nm) gemessen werden. 48 h nach Transfer der beiden Plasmide in KELLY-Zellen mit Hilfe des Reagenz Gene Juice erfolgte die Quantifizierung der grün und rot fluoreszierenden Zellen. Die KELLY-Zellen wurden hierfür trypsiniert, pelletiert und in 200 μ L PI (Stockkonzentration: 1 mg/mL, 1:1000 in PBS verdünnt) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 5 min auf Eis (unter Lichtausschluss). Es wurden 10000 Zellen im manuell eingesetzten Gate gezählt, wobei der Aufnahmemodus logarithmisch eingestellt wurde. Bei der anschließenden FACS-Messung wurde parallel der prozentuale Anteil von grün (transfiziert) und rot (avital) fluoreszierenden Zellen pro Ansatz ermittelt (Abb.10). Daraus konnten direkt Rückschlüsse auf Effizienz und Toxizität der Versuche gezogen werden.

4.2.4.3 Auswertung der FACScan-Messungen

Auswertung primärer leukämischer Zellen:

$$\text{Spezifische Apoptose [\%]} = (\text{Zytostatikum-induzierte Apoptose [\%]} - \text{Spontanapoptose [\%]}) / (100 - \text{Spontanapoptose [\%]}) * 100$$

Auswertung transfizierter KELLY-Zellen:

GFP diente als Transfektionskontrolle und wurde im Kanal 1 gemessen. PI diente zur Färbung toter Zellen. In einer Darstellung in Form eines DotPlots wurden die beiden Parameter gegeneinander aufgetragen und Grenzen so gesetzt, dass vier Quadranten entstanden. Tabelle drei demonstriert beispielhaft die statistische Auswertung einer Probe.

Tab. 3. Auswertungstabelle der Abb. 10

Quadrant	% „Gated“
UL	30.96
UR	29.00
LL	19.37
LR	20.66

UL = *upper left*, UR = *upper right*, LL = *lower left*, LR = *lower right*.

4.2.5 Proteinbiochemische Methoden

4.2.5.1 Herstellung von zytoplasmatischen Lysaten und Kernlysaten

10^6 KELLY-Zellen wurden in 2 mL Medium in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach etwa 24h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen stimuliert. Hierzu entnahm man aus jedem Well etwa 70% des Mediums und überführte sie in ein beschriftetes Eppendorf-Tube. Die Platte wurde zurück in den Brutschrank gestellt. Der Stimulans wurde in entsprechender Konzentration in jedes Eppendorf-Tube pipettiert, gevortext und in das zugehörige Well zurückgegeben. Die Platte wurde wieder im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation wurde in Vorwärts- oder Rückwärtskinetik durchgeführt. Für die Herstellung von Kernlysaten wurden 10^5 Zellen in 1 mL Medium in einer 24-Well-Platte ausgesät und nach 24 h wie oben beschrieben stimuliert.

Zelllyse:

Nach Inkubation wurde die Kulturplatte auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1 mL PBS (4 °C) gewaschen. Je nach Dichte des Wells wurden die Zellen mit 150 bzw. 250 μ L Lysispuffer (SDS Sample Buffer), der kurz zuvor mit Proteinaseinhibitoren (1%) und Phosphataseinhibitoren (10%) versetzt wurde, abgeschabt, in ein beschriftetes Eppendorf-Tube überführt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden bei -20 °C eingefroren.

Das Zelllysat wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit Ultraschall (Amplitude minimal 10%, ca. 5 kurze Impulse) behandelt.

Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend abzentrifugiert. In jede Geltasche wurden 20 μ L Probe aufgetragen.

Zur Kernlysatgewinnung wurde die 24-Well-Platte ebenfalls auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 500 µL PBS (4 °C) gewaschen. Dann wurden pro Well je 100 µL Puffer Kern A pipettiert, der kurz zuvor mit Proteinaseinhibitoren (1%) und Phosphataseinhibitoren (10%) versetzt worden war. Die Platte wurde anschließend für 20 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Dann wurde das Lysat in ein Eppendorf-Tube überführt und 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand, also die zytosolische Fraktion, wurde in ein Eppendorf-Tube überführt.

Zu dem Pellet, der Kernfraktion, wurden 40 µL Puffer Kern B zugegeben und für 20 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden diese ebenfalls mit Ultraschall behandelt (Amplitude minimal 10%, ca. 7 kurze Impulse).

4.2.5.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Kern- und Zytoplasmalysate wurden mit 5x SDS- Ladepuffer (Kern-Lämmli) versetzt, die restlichen Proben enthielten bereits SDS im Lysispuffer und wurden 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus Trenn- und Sammelgel, wobei je nach Proteingröße Trenngele unterschiedlicher Acrylamidkonzentration eingesetzt wurden:

Trenngel (12%-ig):	1.6 mL	ddH ₂ O
	2 mL	Acrylamid Mix (30%)
	1.25 mL	Puffer A
	50 µL	SDS (20%)
	50 µL	APS (10%)
	2 µL	TEMED

Das Trenngel wurde mit 100 µL Isopropanol überschichtet, um einen ebenen luftblasenfreien Übergang zum Sammelgel zu erhalten:

Sammelgel (12%-ig):	680 µL	ddH ₂ O
	170 µL	Acrylamid Mix (30%)
	130 µL	Puffer B

10 µL	SDS (20%)
10 µL	APS (10%)
1 µL	TEMED

Die neben einer Proteinmarkerspur geladenen Proben (20 µL) wurden zunächst auf 30 mA bis zum Durchlaufen des Sammelgels eingestellt, sie trennten sich anschließend in ca. 2 Stunden bei 50 mA (bis die blaue Lauffront des Ladepuffers das Gel vollständig verlassen hatte). Daran schloss sich eine Western Blot Analyse an.

4.2.5.3 Western Blot Analyse

Die während der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennten Proteine konnten mit Hilfe eines spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Zunächst wurden drei Whatmann-Papiere, in Transferpuffer getränkt, in eine Blotkammer eingebracht. Die PVDF-Membran wurde für eine Minute in Methanol aktiviert, kurz in Blotpuffer gewaschen und auf die Whatman-Papiere gelegt. Auf die Membran positionierte man luftblasenfrei das SDS-Gel und eine weitere Lage aus drei getränkten Filterpapieren. Der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte über 90 min bei 80-90 mA pro Membran in der Blotkammer, Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell. Die PVDF-Membran blockierte man anschließend eine Stunde bei RT auf dem Schüttler TBST mit 5% Milchpulver bzw. mit Roti-Block bei Nachweis von Phoshoproteinen. Dann folgten drei Waschschritte in TBST für jeweils 10 min. Zur Detektion des gesuchten Proteins diente ein spezifischer Antikörper, der in 5 mL Blocklösung entsprechend verdünnt wurde. Im Falle von p-IκBα wurde direkt nach der Blockierung die Membran in Roti-Block gelöste Antikörperlösung gebracht. Die Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal in TBST für je 10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (gekoppelt an Meerrettichperoxidase) in Blocklösung erfolgte für eine Stunde bei RT. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für 10 min in TBST gewaschen.

Der Nachweis der Antikörper erfolgte mit Hilfe einer Chemolumineszenzreaktion, wobei pro Membran 1 mL ECL-Lösung eingesetzt wurde. Die Membran belichtete

während kurzer Exposition einen Röntgenfilm, der dann entwickelt, fixiert und getrocknet wurde.

5 ERGEBNISSE

5.1 TRAIL-INDUZIERTE PROLIFERATION

5.1.1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, eine vollkommen neue unerwünschte Wirkung von Krebstherapie, die unsere Arbeitsgruppe erstmals beschrieben hatte, auf Tumorzelllinien und primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie näher zu charakterisieren. Meine Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass Substanzen, die mit dem Ziel der Zelltod (Apoptose)-Induktion auf Tumorzellen gegeben werden, gegenteilige, anti-apoptotische Funktionen auf gewissen Tumorzellen haben können und das Überleben und sogar die Proliferation dieser Tumorzellen unterstützen können. Weil in der Therapie von Tumoren jedoch auf keinen Fall Wachstums-fördernde Substanzen gegeben werden sollen, hat sich die Arbeitsgruppe zum Ziel gesetzt, diese neue unerwünschte Wirkung besser zu charakterisieren, um sie verhindern oder minimieren zu können. In diesem Rahmen war das Ziel dieser Arbeit ein zweifaches: Zum einen sollte ich die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB für TRAIL-induzierte Proliferation von Tumorzellen mit einem molekularen Ansatz darstellen, zum anderen sollte ich die Häufigkeit von Proliferations-Induktion durch Zytostatika auf Tumorzelllinien und primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie ermitteln.

TRAIL ist ein zukünftiges Zytostatikum, welches sich zur Zeit in Phase I und II klinischen Testungen befindet. Meine Arbeitsgruppe hat in mehreren Artikeln publiziert, dass TRAIL Proliferation auf gewissen Tumorzellen induziert. Dabei wurden die Tumorzellen – abhängig von ihrer Reaktion auf TRAIL - in 4 Gruppen geteilt: Zellen, die mit Apoptose reagieren, gehören in Gruppe A, die die mit Proliferation reagieren, in Gruppe P, solche, die keinen messbaren Effekt von TRAIL zeigen, in Gruppe 0 und die, die ein Mischbild aus Apoptose und Proliferation zeigen, in Gruppe AP. Eine Gruppe P- Zelllinie ist die Neuroblastom-Zelllinie KELLY, mit der ich meine Arbeiten durchführte. Es galt, herauszufinden, was für eine Rolle der Transkriptionsfaktor NF-κB, der die Transkription vieler Proliferations-fördernder Gene reguliert, in der TRAIL-induzierten Proliferation von Tumorzellen spielt. Um

dies zu klären, wählte ich einen molekularen Zugang und überexprimierte den NF-κB Inhibitor IκBα in KELLY-Zellen.

5.1.2 TRAIL-induzierte Proliferation auf KELLY-Zellen

Zu Beginn meiner Experimente reproduzierte ich die TRAIL-vermittelte Proliferation auf der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, um zu sehen, ob sie auch in meinen Händen proliferierten. KELLY-Zellen wurden mit den Konzentrationen 40, 10 und 4 ng/mL TRAIL stimuliert. Die Zunahme der Zelldichte wurde mittels Cellscreen, einem automatisierten Mikroskop, dass die gleichen Zellen über die Zeit immer wieder fotografiert und die mit Zellen belegte Fläche und damit die Zellkonzentration ermittelt (siehe Methoden). Proliferation zeigten KELLY-Zellen in den TRAIL- Konzentrationen 40 und 10 ng/mL (s. Abb.5).

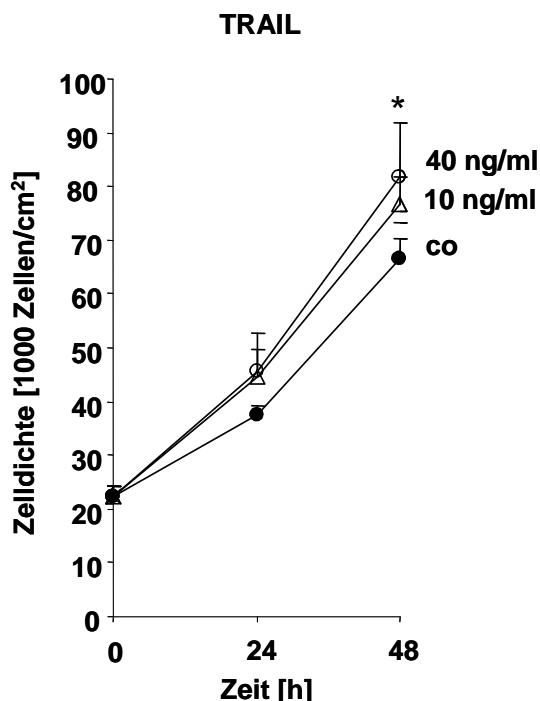


Abb. 5. KELLY-Zellen wurden für 48 Stunden mit TRAIL in angegebenen Konzentrationen inkubiert. Proliferation (= Zunahme der Zelldichte) wurde mittels Cellscreen gemessen. co = unbehandelte Kontrolle. (*=statistisch signifikant, n = 3, Fehlkerbalken stellen SEM dar. p<0,05, One Way RM Anova)

5.1.3 Aktivierung von NF-κB auf KELLY-Zellen

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe legten eine Beteiligung des klassischen NF-κB-Signalweges bei der TRAIL-vermittelten Proliferation nahe. Bei diesem Signalweg wird zytoplasmatisches, inaktives, an inhibierendes IκBα gebundenes NF-κB aktiviert, indem IκBα phosphoryliert wird und über das Proteasom abgebaut wird, welches die Translokation von aktivem NF-κB in den Kern ermöglicht. Meine Aufgabe war es, die Aktivierung des NF-κB-Signalweges auf KELLY-Zellen nach Stimulation mit TRAIL per Western Blot-Analyse zu untersuchen. Dazu habe ich zum einen die Phosphorylierung und den Abbau des zytoplasmatischen Inhibitors von NF-κB, IκBα, dargestellt. Als einen zweiten Parameter der NF-κB-Aktivierung habe ich die Translokation der NF-κB-Untereinheit p65 in den Nukleus durch spezifische Antikörper gezeigt. Um das Zeitfenster zu bestimmen, in dem die Phosphorylierung von IκBα sowie die Translokation von p65 stattfindet, habe ich die Kinetik der NF-κB-Aktivierung für die verwendete Zelllinie KELLY zunächst mit Hilfe von TNFα, einem Zytokin und klassischem NF-κB-Aktivator, untersucht. Abb. 6 zeigt nach Stimulation mit TNFα die Phosphorylierung von IκBα bereits nach drei Minuten mit einem Maximum nach 5 Minuten. Bedingt durch den nachfolgenden proteasomalen Abbau von IκBα verschwindet IκBα dann aus dem Zytosol. Durch die schnelle NF-κB-regulierte Nachproduktion erscheint es bereits nach 60 Minuten wieder im Zytosol mit der gleichen konstitutiven Phosphorylierungsrate wie vor der Stimulation.

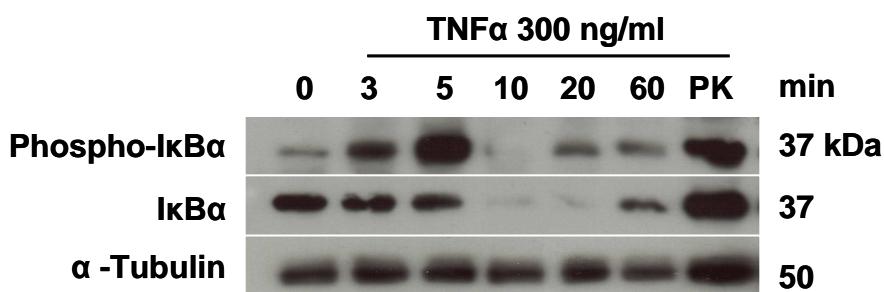


Abb. 6. Aktivierung des NFκB-Signalweges durch Stimulation mit TNFα . KELLY-Zellen wurden mit 300 ng/ml TNFα über 3, 5, 10, 20 und 60 Minuten stimuliert und per Western Blot Analyse detektiert. α-Tubulin diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. PK = Positiv-Kontrolle (HELA Zellen 5 Minuten mit 100 ng/ml TNFα stimuliert).

Um die TRAIL-Konzentration zu ermitteln, die zur Aktivierung dieses Signalweges in KELLY-Zellen führte, wurden diese Zellen mit unterschiedlichen TRAIL-Konzentrationen behandelt (Abb. 7A). Dabei zeigte sich die maximale Abnahme von I κ B α nach Stimulation mit 1000 ng/ml TRAIL, das im Folgenden als Basisdosierung gewählt wurde.

Abb. 7B zeigt, dass der Abbau von I κ B α auf KELLY-Zellen bereits nach 5 bis 10 Minuten erfolgte. Bereits nach 20 Minuten war eine NF- κ B- getriggerte Nachproduktion von I κ B α im Zytosol der Zelle wieder detektierbar.

Die Translokation von p65 in den Nukleus ist in Abb. 7C zu sehen. Kerne stimulierter Zellen wurden dazu isoliert und mittels Western Blot- Analyse auf Anwesenheit von p65 untersucht. 60 bis 90 Minuten nach Stimulation nahm die Menge an p65 im Kern stark zu. Der Nachweis von Histon 1 zeigte die gleichmäßige Beladung des Gels. Eine unspezifische Interaktion des p65-Antikörpers mit dem Marker führte zu einem Hintergrundsignal am linken Rand der oberen Abbildung.

Mit diesen Western Blot-Anlaysen konnte also eine Aktivierung des NF- κ B- Signalweges durch TRAIL auf der Neuroblastom-Zelllinie KELLY nachgewiesen werden.

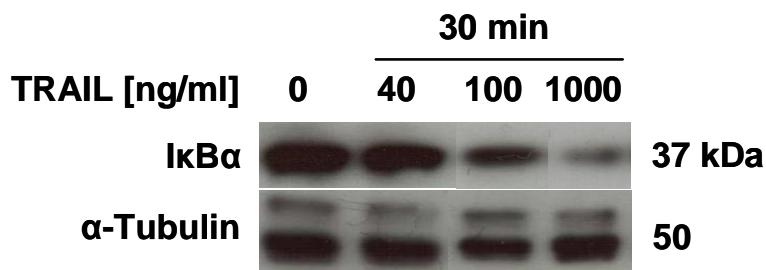
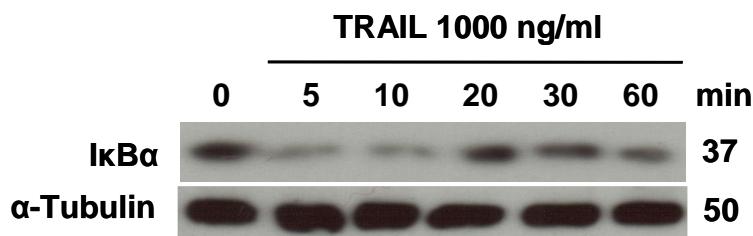
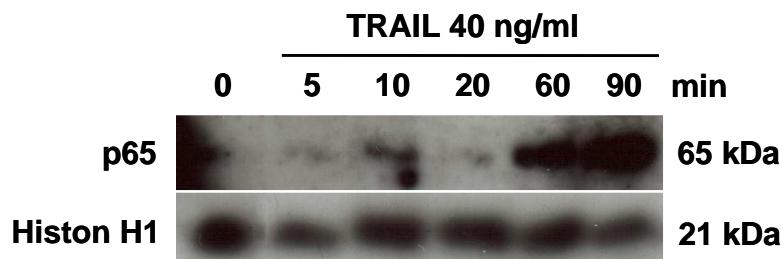
A**B****C**

Abb. 7. A: Aktivierung des NF-κB-Signalweges durch TRAIL. Zytosolisches IκBα wurde nach Stimulation mit 40, 100 und 1000 ng/mL TRAIL per Western Blot-Analyse detektiert. α-Tubulin diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. **B:** Zytosolisches IκBα wurde nach Stimulation mit 1000 ng/mL TRAIL detektiert. **C:** KELLY Zellen wurden mit 40 ng/mL TRAIL für 5, 10, 20, 60 und 90 min inkubiert. Anschließend wurde in Kernlysaten p65 (Untereinheit von NF-κB) mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen. Histon H1 diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Links im Bild ist eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Marker zu sehen.

5.1.4 Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch molekulare Inhibition von NF-κB

Um die Beteiligung des Signalweges auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde der Signalweg unterbrochen. Sollte der NF-κB-Signalweg eine entscheidende Rolle für die TRAIL-vermittelte Proliferation spielen, müsste so nach Stimulation mit TRAIL

eine Verhinderung der TRAIL-induzierten Proliferation und gegebenenfalls sogar ein Wiedererlangen von TRAIL-induzierten Apoptose zu beobachten sein.

Die Blockierung des NF-κB- Signalweges in KELLY-Zellen erfolgte durch Überexpression des NF-κB-Inhibitors, IκBα. Hierzu wurde ein Vektor (prC) mit der Sequenz von IκBα, dem Inhibitor von NFκB, in KELLY-Zellen transfiziert. Ein Überangebot an NF-κB-Inhibitoren verhindert die Aktivierung von NF-κB und damit die Freisetzung von p50 und p65 (aktive Untereinheiten von NF-κB). Die DNA wurde transient und mittels Lipofektion transfiziert. Dazu habe ich das Transfektionsprotokoll folgender Maßen optimiert: Um die Effizienz der Transfektion prüfen zu können, wurde ein Vektor (pcDNA 3.1) mit GFP (Green Fluorescent Protein) kotransfiziert (im Verhältnis GFP-Vektor: Ziel-Vektor 1:5) (s. Abb. 8). Als Transfektionskontrolle dienten KELLY- Zellen, die mit einem Leer-Vektor behandelt wurden.

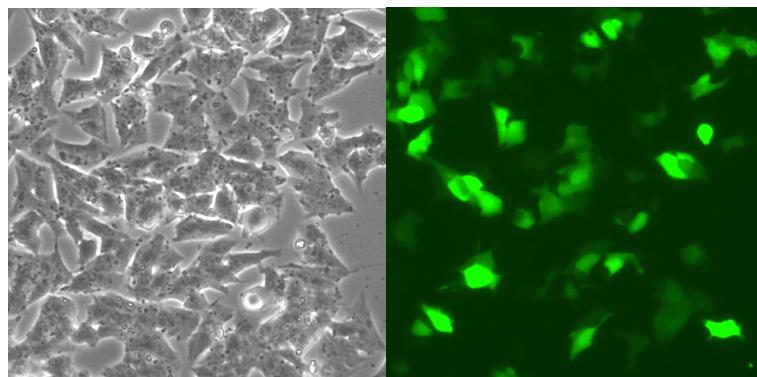
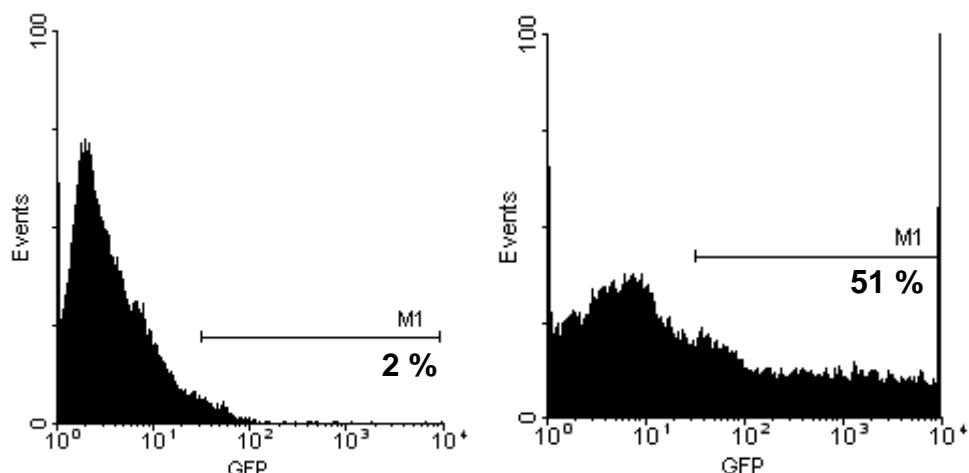
A**B**

Abb. 8. A: Fluoreszenzmikroskopisches Bild von KELLY-Zellen, kotransfiziert im Verhältnis 1:5 mit einem GFP-exprimierenden pcDNA 3.1 Vektor und einem pRC Vektor. Links zur Kontrolle das Durchlichtbild. **B:** Histogramme der FACS-Analyse von kotransfizierten KELLY Zellen (links: unbehandelte Kontrolle, rechts: kotransfiziert mit GFP-Vektor 1:5). Die Analyse des grünen GFP-Kanals zeigt eine Rechtsverschiebung, die der Transfektionseffizienz gleichgesetzt werden kann. (s. M1 im rechten Bild = 51%). Events = Zellzahl

Mit meinem optimierten Protokoll konnte ich etwa die Hälfte aller KELLY-Zellen mit GFP transfizieren. Da die interessierende DNA für IkB α oder die Kontrolle im Überschuss zur GFP-DNA zugegeben wurde, wurde davon ausgegangen, dass alle mit GFP-transfizierten Zellen auch die fünf-fache Menge an der interessierenden DNA enthalten. Diese Zellen waren im Weiteren Gegenstand meiner Untersuchungen.

Die Toxizität von TRAIL wurde durch PI-Färbung ebenfalls mit FACS-Analyse ermittelt (s. Abb. 9).

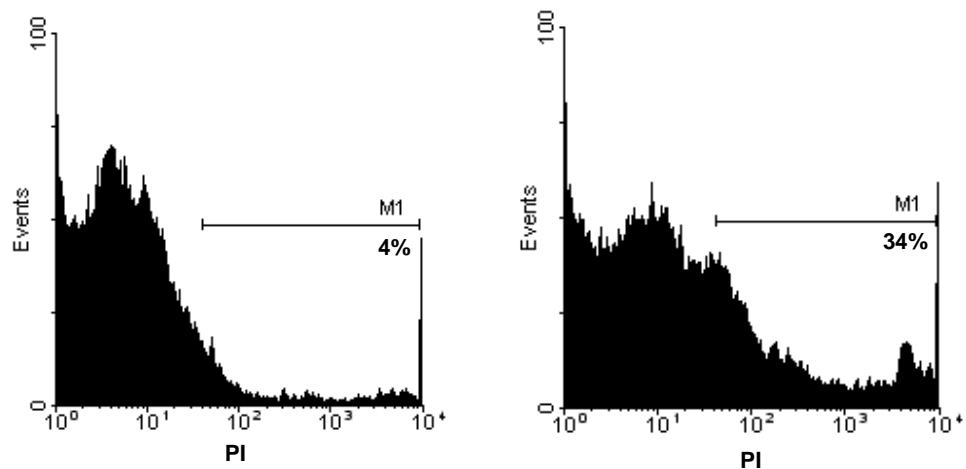


Abb. 9. Histogramme der FACS-Analyse von Apoptosemessungen: Exemplarisch sei hier eine mit TRAIL stimulierte KELLY-Zell-Probe dargestellt. links: unbehandelte Kontrolle, rechts: mit TRAIL behandelte Kontrolle. Beide Proben sind PI gefärbt und im Kanal 3 gemessen. Die Analyse des roten PI-Kanals zeigt eine Rechtsverschiebung, die der Apoptose der Zellen nach TRAIL-Stimulation gleichgesetzt werden kann (30%).

Abb. 10 zeigt exemplarisch eine cotransfizierte und mit TRAIL stimulierte Probe dar.

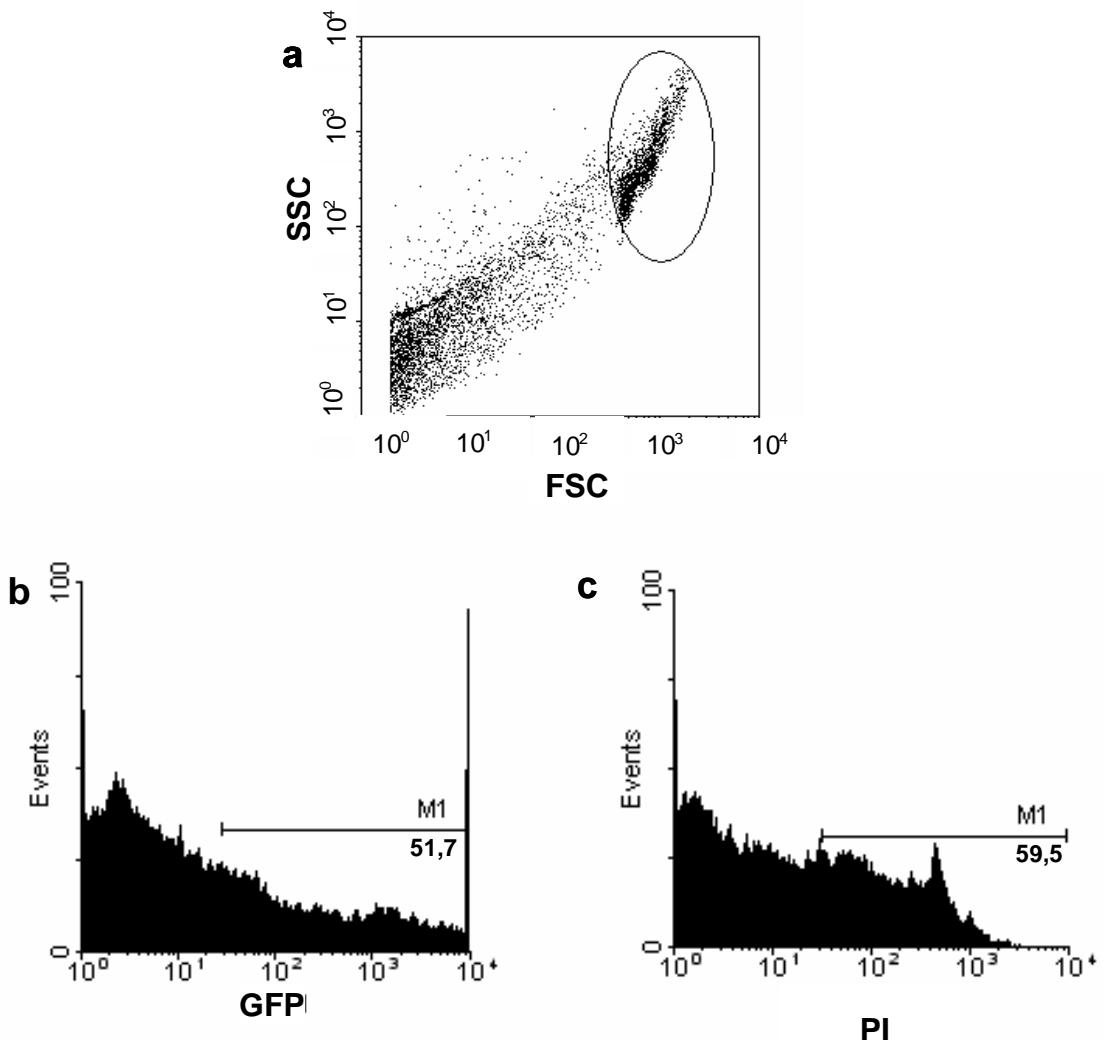


Abb. 10. Exemplarische Darstellung der Doppelkanalfärbung mittels FACscan (a) Forwardside Scatter Analyse, (b) GFP-Fluoreszenz-, (c) PI-Fluoreszenz- Histogramme. Dargestellt ist eine $\text{IkB}\alpha$ und GFP cotransfizierte KELLY-Zell-Probe. 24 h nach Transfektion wurden KELLY-Zellen mit 2000 ng/ml TRAIL stimuliert und weitere 24 h später mittels FACscan gemessen. Die Transfektionseffizienz beträgt 51,7 % (b). 59,5 % der Zellen sind apoptotisch (c).

Die Leer-Vektor transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit TRAIL ein besseres Überleben (eine negative spezifische Apoptose) von 6%. Dagegen wiesen die $\text{IkB}\alpha$ -überexprimierenden Zellen nach TRAIL- Stimulation eine spezifische Apoptose von 15% auf (s. Abb. 11). Die SEM (Standardfehler, ‘*standard error of the mean*’) betrug bei der Transfektion mit dem Leervektor 6% und mit dem $\text{IkB}\alpha$ -exprimierenden Vektor 9%. Abb. 10 stellt eine exemplarische Darstellung der durchgeföhrten Doppelfärbung GFP/PI dar.

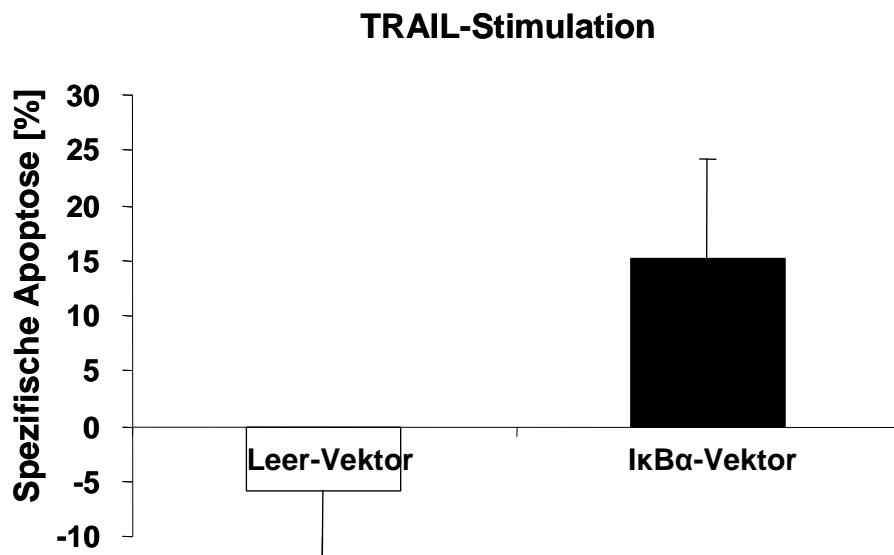


Abb. 11. Der Effekt von TRAIL auf transfizierte KELLY-Zellen. Spezifische Apoptoseraten von KELLY-Zellen, transfiziert mit dem Leer-Vektor und dem IkBa Wildtyp-exprimierenden Vektor nach Stimulation mit 2000 ng/mL TRAIL für 24 Stunden. Die IkBa- überexprimierenden Zellen weisen eine spezifische Apoptose von 15% auf, während die Kontrollzellen (Leer-Vektor überexprimierende Zellen) ein besseres Überleben (-6) zeigen. Die Apoptoseraten wurden jeweils mittels PI-Färbung am FACSscan erhoben. n=5

Die Überexpression von IkBa war also in der Lage, TRAIL-induzierte Proliferation zu verhindern und TRAIL-induzierte Apoptose zu ermöglichen. Damit konnte ich zum einen zeigen, dass NF- κ B das Signal für TRAIL-induzierte Proliferation vermittelt. Die Aktivierung des Signalwegs ist notwendig, dass KELLY-Zellen auf TRAIL mit Proliferation reagieren. Zum anderen zeigen meine Ergebnisse, dass die Inhibition von NF- κ B eine Möglichkeit darstellen, wie TRAIL-induzierte Proliferation wieder in TRAIL-induzierte Apoptose umgewandelt werden kann und Apoptose-resistente Tumorzellen für TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisiert werden können.

Weitere Studien sollten untersuchen, ob eine Inhibition von NF- κ B durch klinisch einsetzbare Substanzen wie das Zytostatikum Bortezomib (Velcade®) TRAIL-induzierte Proliferation auch in Patienten zuverlässig verhindern und TRAIL-induzierte Apoptose in vormals Apoptose-resistenten Zellen ermöglichen können.

Bisher konnte ich zeigen, dass die neue Nebenwirkung der Tumorzell-Proliferation nach Stimulation mit TRAIL über NF- κ B vermittelt wird. TRAIL befindet sich zurzeit in Phase I und II Studien der klinischen Testung und wird deswegen erst bei einer sehr kleinen Anzahl von Krebspatienten eingesetzt.

Im Gegensatz zur seltenen Anwendung von TRAIL werden zugelassene Zytostatika vielfach täglich eingesetzt. Meine Arbeitsgruppe stellte sich deswegen die Frage, ob die neue Nebenwirkung der Tumorzell-Proliferation auf TRAIL beschränkt sein würde oder auch klinisch bereits vielfach eingesetzte Zytostatika einschließen würde und damit von viel größerer klinischer Relevanz sein würde. Dann würde es sich um generelles Phänomen handeln, dass pro-apoptotische Substanzen unter gewissen Umständen anti-apoptotische Effekte auf Tumorzellen auslösen können. Dies müsste weiter untersucht werden und klinisch verhindert oder zumindest vermindert werden. Bevor ich mit meiner Arbeit startete, hatte eine Doktorandin der Arbeitsgruppe zeigen können, dass es sehr wohl Zytostatika gibt, die auf Tumorzelllinien Proliferation zeigen können. So induzierte zum Beispiel Epirubicin Proliferation auf der Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 oder Dexamethason auf der Nierenzell-Karzinom-Zelllinien RH-30. Meine Aufgabe war es nun, die Häufigkeit dieser neuen Nebenwirkung zu charakterisieren. Dabei wurden mir folgende Fragen gestellt:

1. Können Zytostatika aller verschiedenen Wirkgruppen Proliferation auf Tumorzellen induzieren? Konkret: Können auch Antimetabolite Proliferation auf Tumorzellen induzieren?
2. Kann auf Tumoren aller Klassen Proliferation durch Zytostatika induziert werden? Konkret: Kann auch auf mesenchymalen Tumorzellen Proliferation durch Zytostatika induziert werden?
3. Wie häufig ist Zytostatika-induzierte Proliferation auf Tumorzelllinien? Konkret: Wie häufig induzieren 15 ausgewählte Therapeutika Proliferation auf 2 ausgewählten Tumorzelllinien?
4. Wie häufig ist Zytostatika-induzierte Proliferation auf primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie? Insbesondere: Wie häufig induzieren 7 ausgewählte Zytostatika der Leukämie-Therapie Proliferation auf 7 ausgewählten Proben von Kindern mit akuter Leukämie?

Zur Beantwortung dieser Fragen stimulierte ich die Tumorzellen in der Zellkultur und verfolgte ihr Wachstum mit Hilfe des Cellscreen-Gerätes (siehe oben und unter Methoden).

5.2 ZYTOSTATIKA-INDUZIERTE PROLIFERATION

5.2.1 Proliferation durch einen Antimetaboliten

Vorarbeiten zeigten, dass Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkprinzipien zur Zytostatika-induzierter Proliferation führten. Als Beispiele sind Epirubicin, ein Interkalanz sowie Etoposid, eine Topoisomerase II-Inhibitor, zu nennen.

Um herauszufinden, ob auch ein Vertreter der Antimetaboliten oder Spindelgifte dieses Phänomen hervorrufen konnte, wurden verschiedene Zelllinien (U373, MDA-MB, CADO) mit verschiedenen Zytostatika (5-FU, 6-TG, Ara C, Methotrexat und Vincristin) getestet.

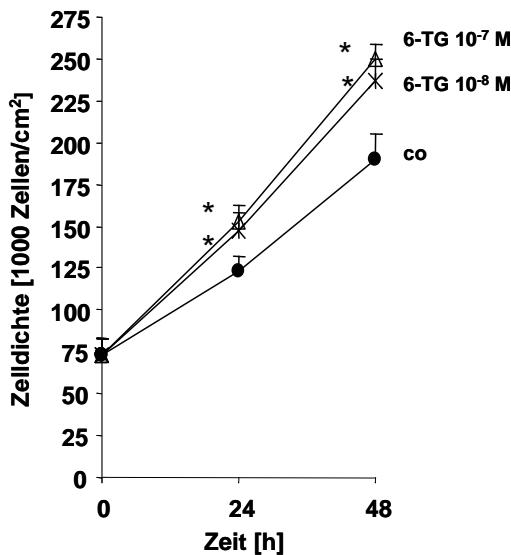


Abb. 12. 6-TG, ein Antimetabolit, induziert in den in der Graphik aufgeführten Konzentrationen Proliferation auf CADO Zellen (*=statistisch signifikant, n=4, p<0,05, RM Anova on Ranks). Die Balken stellen die SEM dar.

Dabei zeigte 6-Thioguanin (6-TG), ein Vertreter der Antimetabolite, am deutlichsten Proliferation auf Ewing Sarkom-Zelllinie CADO (Abb. 12).

Damit konnte ich zeigen, dass auch ein Antimetabolit, nämlich das 6-TG, Proliferation auf einer Tumorzelllinie induziert. Da in der Arbeitsgruppe bereits vorher von Zytostatika aller anderen Gruppen gezeigt worden war, dass sie Proliferation induzieren können, konnte in Summe somit gezeigt werden, dass grundsätzlich Zytostatika aller Wirkklassen in der Lage sind, unter gewissen Umständen Proliferation in Tumorzellen zu induzieren.

5.2.2 RH 30- und SAOS-2-Zellen

Um die Häufigkeit des Auftretens der Zytostatika-induzierten Proliferation zu ermitteln, wurden in der Arbeitsgruppe Tumorzelllinien unterschiedlichen embryonalen Ursprungs untersucht. Dabei war das Phänomen auf der neuroektodermalen Neuroblastom-Zelllinie Kelly sowie auf der epithelialen Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7 bereits gezeigt. Hier galt es, Zelllinien mesenchymalen Ursprunges zu finden, die ebenfalls nach Zytostatika-Stimulation Proliferation zeigten. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die zwei Zelllinien mesenchymalen Ursprungs: Rhabdomyosarkom-Zelllinie RH 30 und die Osteosarkom-Zelllinie SAOS-2 mit Dexamethason stimuliert.

Dexamethason zeigte in Vorarbeiten bereits auf unterschiedlichen Zelllinien Proliferation. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass Dexamethason allein bei der Therapie von Leukämien und Lymphomen als Zytostatikum zum Einsatz kommt. Dexamethason wird in der Onkologie als supportive Therapie zur Behandlung von Zytostatika-Nebenwirkungen wie Nausea und Vomitos eingesetzt (siehe Diskussion). Die Proliferation wurde auch hier mittels Cellscreen gemessen. Dabei wurden auf beiden Zelllinien Proliferation beobachtet. Abb. 13 zeigt die Proliferation durch Dexamethason auf der Osteosarkomzelllinie SAOS-2. Hier lagen die Werte der stimulierten Zellen stets über den Werten der unbehandelten Kontrollen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Phänomen der Zytostatika-induzierten Proliferation auf Zelllinien unterschiedlichen embryonalen Ursprunges auftreten kann.

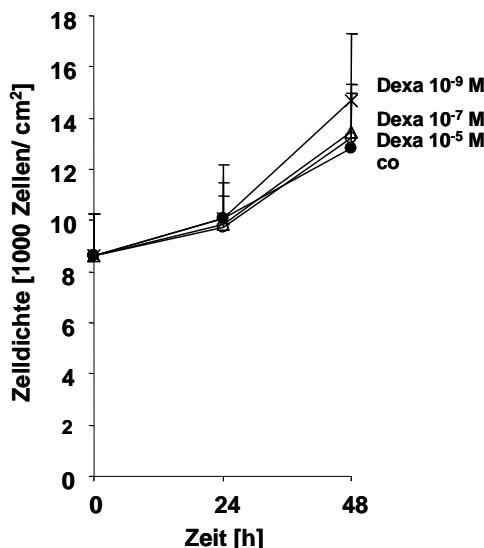


Abb. 13. Das Glucocortikoid Dexamethason, zeigt in den in der Graphik aufgeführten Konzentrationen Proliferation auf der mesenchymalen Zelllinie SAOS-2 (n=3). Die Balken stellen die SEM dar.

5.2.3 Zytostatika-induzierte Proliferation auf CADO- und MCF-7-Zellen

Um weiterhin die Häufigkeit des Auftretens von Zytostatika-induzierter Proliferation zu ermitteln, wurden weitere zwei Zelllinien zur Testung herangezogen. Es wurden willkürlich zwei Zelllinien mit unterschiedlichem Ursprung ausgewählt. Die Ewing Sarkom-Zelllinie CADO, deren embryonaler Ursprung als mesenchymal diskutiert wird (Tirode et al., 2007) und die Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7, die einen epithelialen Ursprung hat.

Diese beiden Zelllinien wurden mit 15 zytostatischen Agenzien unterschiedlicher Wirkprinzipien behandelt. Die Proliferation wurde mittels Cellscreen gemessen.

Zum Verständnis der Definition von Proliferation ist der Begriff der Plasma-Spitzen-Konzentration zu erläutern: Die Plasma-Spitzen-Konzentration ist die maximal im Serum eines Patienten erreichbare Konzentration einer Substanz, in diesem Fall eines Medikaments. Im Rahmen unserer Proliferationsexperimente wurden nur Konzentrationen unterhalb der Plasma-Spitzen-Konzentration verwendet. Die Proliferation ist dadurch charakterisiert, dass der Wert der Plasma-Spitzen-Konzentration (s. Tab. 2 in Methoden) sowie der der geringeren Konzentrationen zu Proliferation führten, d.h. dass die Kurven der entsprechenden Werte über der

Kontrollkurve verlaufen. Als Kontrollkurve wurde im Folgenden die Kurve bezeichnet, die das Wachstumsverhalten der unstimulierten Zellen darstellte.

5.2.4 CADO-Zellen

In Abb. 14 werden die Ergebnisse der Experimente mit den CADO-Zellen und den 15 eingesetzten Zytostatika dargestellt.

Für CADO-Zellen zeigten Actinomycin D, ein Interkalanz und das Glukokortikoid Dexamethason Proliferation. Cyclophosphamid und Dacarbacin, zwei Subgruppen von Alkylantien, sowie das Spindelgift Paclitaxel führten zu Proliferation. In diesem Fall induzierte das Zytostatikum gemäß der Gruppe AP in einer Konzentration, die der Plasma-Spitzen-Konzentration entsprach, Apoptose und in niedrigeren Konzentrationen Proliferation. Dementsprechend verlaufen die Kurve mit dem Wert der Plasma-Spitzen-Konzentration und eine niedrigere Konzentration unterhalb der Kontrollkurve. Dagegen verlaufen die Kurven, die noch niedrigere Konzentrationen darstellen, oberhalb der Kontrollkurve, was für Proliferation spricht (s. Abb. 14). Resistenz, also Gruppe 0 entsprechend, zeigte die Zelllinie für die Alkylantien Carmustin und Cisplatin. Hier sieht man, dass die Kurven, die das Wachstum der stimulierten Zellen darstellen, im Verlauf nicht deutlich von der Kontrollkurve abweichen. Apoptose, wurde induziert durch über 50% der zytostatischen Agenzien: AraC (Cytarabin), 5-FU, Methotrexat, alle drei Antimetaboliten, Epirubicin, ein Interkalanz, Topotecan, VP-16, beide Topoisomerasehemmer, Vincristin, ein Mitosehemmer, und γ -Strahlung. In diesem Fall verlaufen die Kurven der stimulierten Zellen selbst bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen als der Plasma-Spitzen-Konzentration deutlich unterhalb der Kontrollkurven.

Insgesamt zeigen ein drittel der eingesetzten Zytostatika auf der Ewing Sarkom-Zelllinie CADO Proliferation. Eine Zusammenfassung der Effekte auf CADO-Zellen ist in Abb. 16 dargestellt.

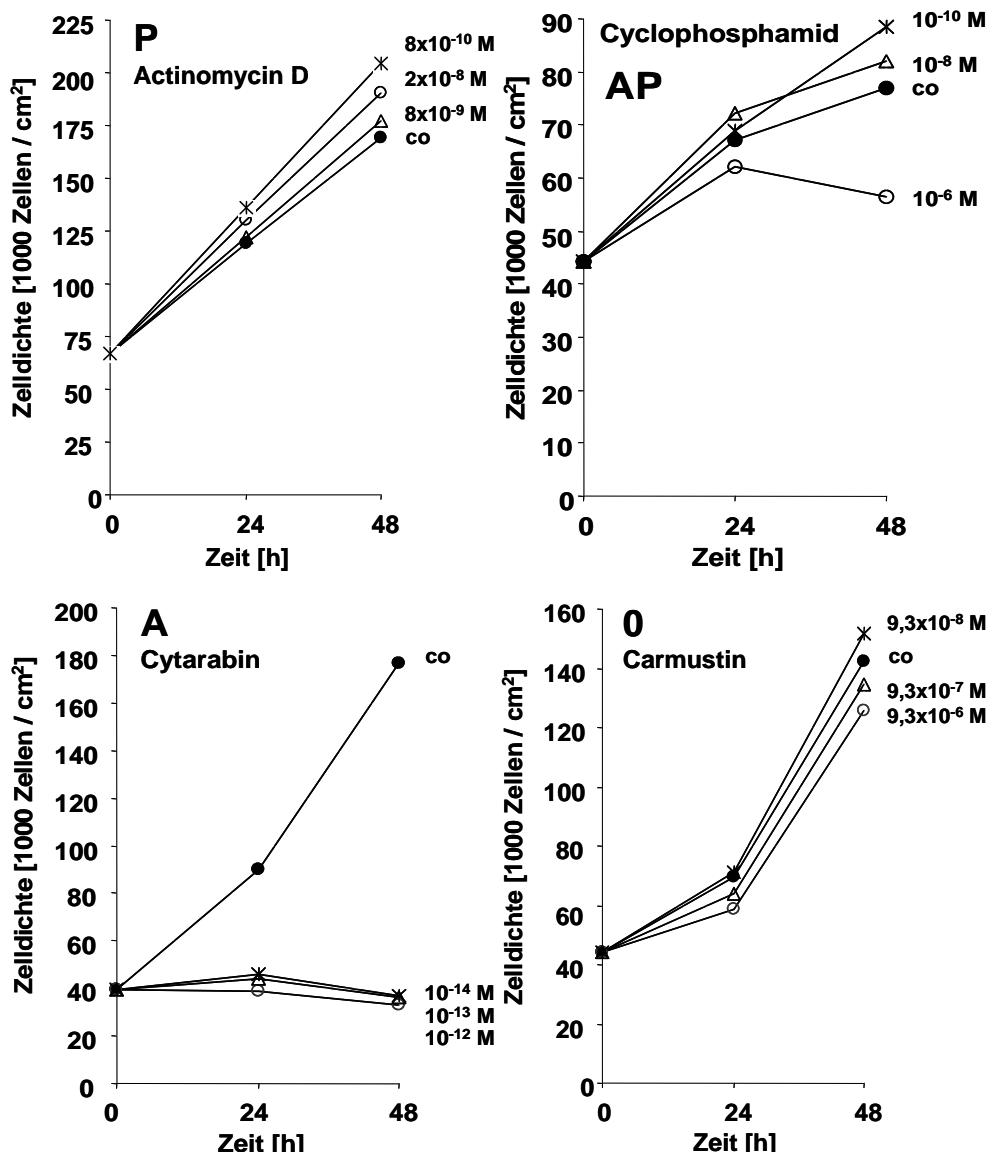


Abb. 14. Exemplarische Darstellung der Phänotypen P (Act D), AP (Cyclophosphamid), A (AraC) und O (Carmustin) auf CADO Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Zytostatika, beginnend mit dem jeweiligen Plasma-Spitzen-Spiegel und darunter liegenden Konzentrationen, 48 Stunden inkubiert. Die Zelldichte wurde mit dem Cellscreen ermittelt.

5.2.5 MCF-7-Zellen

MCF-7 Zellen zeigten Proliferation, wenn sie mit Dexamethason behandelt wurden. Dabei verlaufen alle Kurven, die das Wachstumsverhalten der stimulierten Zellen darstellen, über der Kontrollkurve (s. Abb. 15).

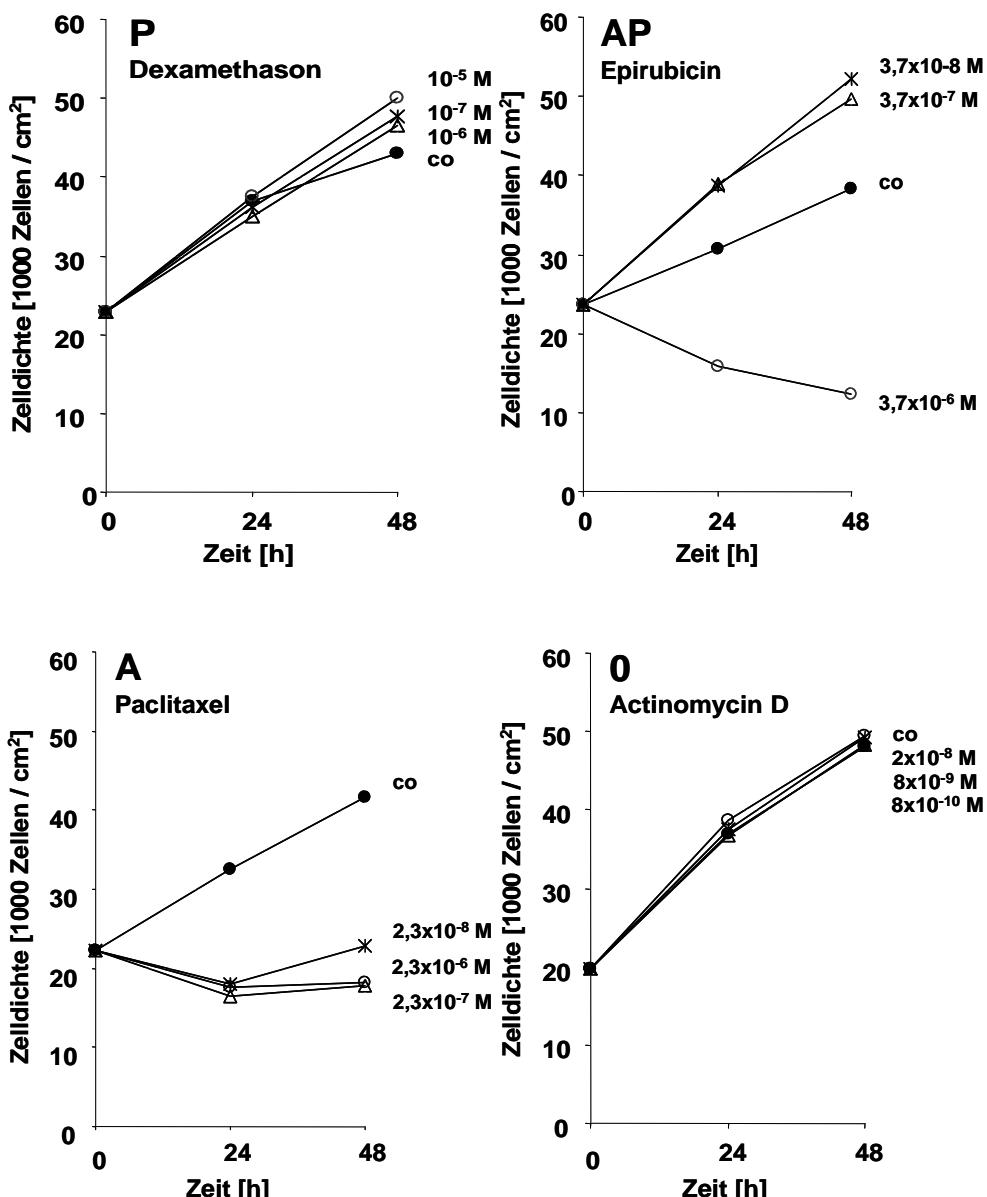


Abb. 15. Exemplarische Darstellung der Phänotypen P (Dexamethason), AP (Epirubicin), A (Paclitaxel) und 0 (Act D) auf MCF-7 Zellen. Dargestellt ist jeweils die Wellbedeckung in % im Laufe von 48 h. Die Legende zeigt die eingesetzten Zytostatika Konzentrationen beginnend mit dem Plasma-Spitzen-Spiegel und darunter liegenden Konzentrationen.

Die Zytostatika Epirubicin, 5-FU, VP-16 und Vincristin induzierten auf den MCF-7 Zellen ebenfalls Proliferation. Die Kurve, die das Proliferationsverhalten der Plasma-Spitzen-Konzentration darstellt, verläuft deutlich unterhalb der Kontrollkurve. Gemäß Gruppe AP verlaufen die Kurven, die das Verhalten niedrigerer Konzentration demonstrierten, oberhalb der Kontrollkurve. Zur Apoptose führten Methotrexat, Topotecan, Cisplatin und Paclitaxel. Hier sieht man, dass die Kurven aller

stimulierten Zellen deutlich unterhalb der Kontrollkurve verlaufen. Resistenz wies die MCF-7 Zelllinie bei Behandlung mit Actinomycin D, AraC, Carmustin, Cyclophosphamid, Dacarbacin und bei γ -Strahlung auf. Hier zeigen die Kurven, die das Proliferationsverhalten der stimulierten Zellen darstellen, einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrollkurve. Eine Übersicht der verschiedenen Substanzwirkungen ist in Abb. 16 zu sehen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in beiden Zelllinien 33% der Zytostatika Proliferation induzieren, davon zu 6 bzw. 12 % in der Plasma-Spitzen-Konzentration. Damit ist Zytostatika-induzierte Proliferation ein häufiges neues Phänomen auf Tumorzellen.

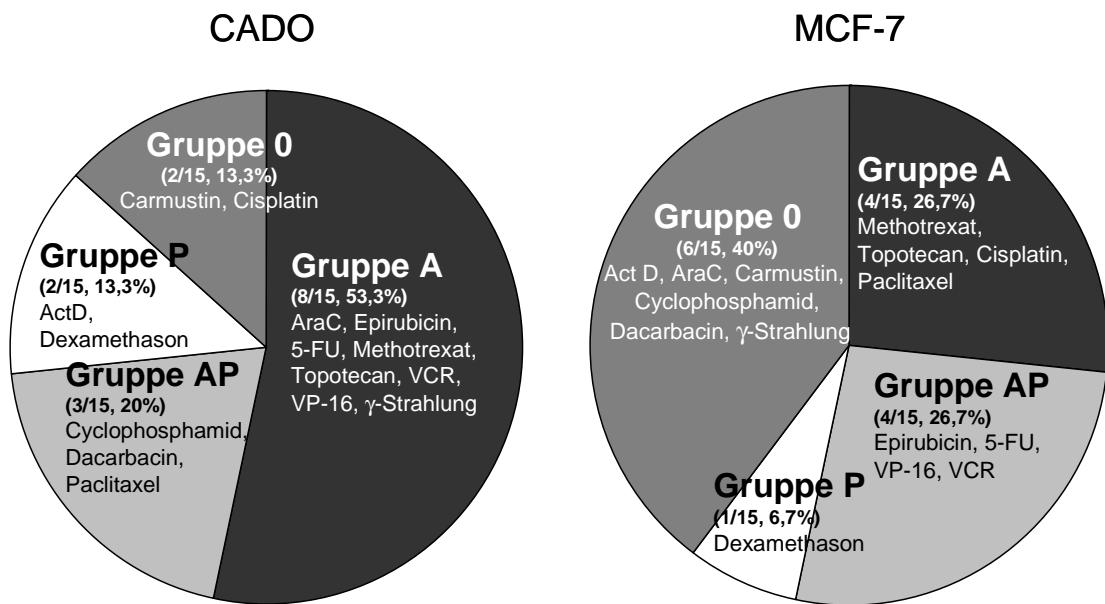


Abb. 16. Zusammenfassung und Gruppierung (Gruppe P, AP, A und 0) verschiedener zytotoxischer Agenzien auf CADO- und MCF-7 Zellen.

5.2.6 Primäre leukämische Zellen

In diesem letzten Abschnitt der Arbeit ging ich der Frage nach, ob und wie häufig Zytostatika auf primären, leukämischen Zellen anti-apoptotische Wirkung zeigen. Da bei Kindern nur geringe Probenmengen entnommen werden können, wurde in unserem Labor ein Tumor-Xenograft-Modell etabliert. Die so in Mäusen passagierten Zellen wurden für die Stimulationsexperimente zur Testung herangezogen. Da an diesen Zellen die Proliferations-Messung erst nach meinem Ausscheiden etabliert

wurde, galt als Surrogatparameteter hier eine Reduktion der Spontanapoptose, ein besseres Überleben der Zellen. Das Überleben der leukämischen Zellen wurde mittels FACscan im FSC/ SSC-Modus bestimmt. Es wurde die durch Zytostatika-induzierte spezifische Apoptose bzw. das spezifische Überleben ermittelt. Die negativen Apoptosewerte, also die Werte mit einem Minuszeichen davor, stellten Überleben dar. Wir definierten, dass Proben mit einem deutlichen Überleben von über -10 als möglicherweise der Gruppe P zugehörig sein könnten. Hierbei wurden von den im Rahmen der CADO- und MCF-7-Testung eingesetzten Zytostatika nur diejenigen eingesetzt, die für die Behandlung von Leukämien relevant waren. Tab. 4 fasst diese Ergebnisse zusammen und Abb. 17 zeigt exemplarisch die Daten von Patient 1.

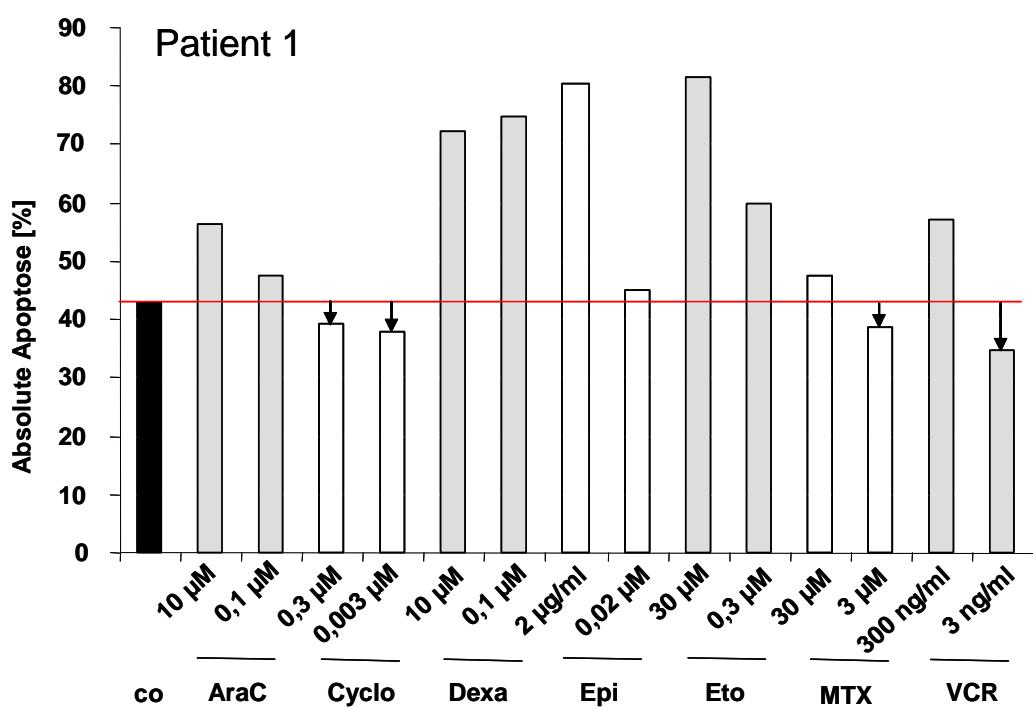


Abb. 17. Exemplarische Darstellung von Patient 1. Nach Stimulation mit den dargestellten Zytostatika-Konzentrationen wurde die absolute Apoptose [%] mit dem FACscan gemessen. In diesem Fall zeigt der Patient nach Behandlung mit Cyclophosphamid, Methotrexat und Vincristin ein besseres Überleben (= niedrigere absolute Apoptose) als die unbehandelten Zellen (co).

Tab. 4. Die Tabelle zeigt die Überlebens-Daten einiger Leukämie-relevanter Zytostatika auf die anonymisierten Patientenproben: 1-7. Die Daten wurden mittels FACScan erhoben. Die Zahlen mit einem Minuszeichen davor stellen Überleben dar, wobei nur die Überlebensdaten über -10 der Gruppe P zugeordnet wurden. Patient 1,5 und 7 weisen zeigen ein besseres Überleben nach Zytostatika-Behandlung.

Patientenproben		1	2	3	4	5	6	7
Spontanapoptose		43	37	22	46	65	28	60
Zytostatika	Konzentration							
Ara C	10 µM	23	81	52	33	48	68	63
	0.1 µM	7	60	24	11	24	40	26
Cyclophos-phamid	0.3 µM	-7	-4	1	-3	3	-2	-3
	0.003 µM	-10	-9	1	-9	-15	-3	8
Dexamethason	10 µM	51	69	92	94	-27	36	61
	0.1 µM	55	75	95	96	-13	35	68
Epirubicin	2 µg/mL	66	93	89	98	73	95	90
	0.02 µg/mL	3	66	33	13	10	13	22
Etoposid	30 µM	67	84	90	92	63	89	92
	0.3 µM	29	70	50	21	65	43	46
Methotrexat	30 µM	7	40	12	-8	-1	16	-12
	0.3 µM	-8	31	12	-5	2	8	-14
Vincristin	300 ng/mL	24	74	59	53	34	80	66
	3 ng/mL	-15	3	17	16	23	36	17

Die meisten Zytostatika induzierten Apoptose in den 7 behandelten Patientenproben. Jedoch zeigten die Patienten 1, 5 und 7 moderate Verbesserung des Zellüberlebens nach Stimulation. Im Fall des ersten Patienten wurde dies mit Cyclophososphamid und Vincristin, beim fünften Patienten mit Cyclophosphamid und Dexamethason sowie beim siebten Patienten mit Methotrexat erreicht.

Damit konnte gezeigt werden, dass antiapoptotische Wirkungen auf primären leukämischen Zellen seltener zu finden sind als auf Zelllinien.

Zusammenfassend konnte mit diesen Daten gezeigt werden, dass die Induktion von Proliferation auf Tumorzellen nicht ein einzeln stehendes Charakteristikum von TRAIL darstellt, sondern von Zytostatika aus allen Wirkklassen auf Tumorzellen aus allen Ursprungsgruppen induziert werden kann. Obwohl diese neue unerwünschte Wirkung selten ist, vor allem auf primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse die Notwendigkeit, diese neue unerwünschte Wirkung intensiver zu untersuchen, um zu verhindern, dass

Krebspatienten mit Medikamenten behandelt werden, die das Wachstum von Tumorzellen fördern.

6 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich eine neue unerwünschte Wirkung, die Zytostatika auf Tumorzellen hervorrufen können: Zytostatika können in Tumorzellen vermehrte Proliferation auslösen. Ich konnte zeigen, dass die in klinischer Testung befindliche Substanz TRAIL Proliferation von Tumorzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auslöst. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass Zytostatika aus allen Wirkklassen auf Tumorzellen aus allen Ursprungsgruppen Proliferation induzieren können. Meine Quantifizierung ergab, dass diese unerwünschte Wirkung zwar weit verbreitet, insgesamt vor allem auf primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie aber selten ist.

Die Signalwegs-Untersuchungen zu TRAIL wurden auf der Neuroblastom-Zelllinie KELLY durchgeführt. Das Arbeiten mit KELLY-Zellen erwies sich als schwierig, da zeitweise eine relativ hohe Spontanapoptose auftrat, was die Auswertbarkeit der Experimente auf Grund der hohen internen Schwankungen erschwerte, besonders in Bezug auf Proliferationsexperimente. Neben der hohen Spontanapoptose sowie der hohen Intraassayvarianz war es für Experimente mit dem Cellscreen insgesamt schwierig, die Versuchsbedingungen konstant zu halten und die geringen Unterschiede der Wachstumsraten reproduzierbar zu erheben. Folgende technische Einflussgrößen waren dabei wichtig: äußere Einflüsse, wie Temperaturveränderungen und Schwankungen im CO₂-Gehalt und Zusatz von Antibiotika im Kulturmedium. Um fehlerhafte Messungen und damit Falschaussagen zu vermeiden, wurde sehr sorgfältig auf entscheidende Parameter des Cellscreens geachtet. Beispielsweise war es wichtig, dass die Zellen exakt fokussiert wurden und der Kontrast hoch genug war, so dass die gesamte Fläche, die mit Zellen bedeckt war, korrekt erfasst wurde.

Bedingt durch die soeben genannten technischen Schwierigkeiten wurden möglicherweise weniger Zytostatika- induzierte Proliferation identifiziert, als vermutlich tatsächlich vorhanden. Besonders im Falle von primären Leukämiezellen kamen die kurzen in-vitro-Lebzeiten erschwerend hinzu. Es ist also denkbar, dass die Häufigkeit der Zytostatika-induzierten Proliferation in den vorliegenden Daten unterschätzt wird und diese neue unerwünschte Wirkung häufiger auftritt als hier dargestellt.

Für die Transfektionsexperimente bestand die größte Schwierigkeit darin, ein geeignetes, schonendes Transfektans für die KELLY-Zellen zu finden. Im Rahmen einer transienten Transfektion war das Ziel, eine relativ hohe Transfektionseffizienz zu erreichen. Erzielt wurde allerdings durchschnittlich eine Transfektionseffizienz von etwa 50%.

Bei diesem Versuchsaufbau lag die weitere technische Herausforderung darin, einen passenden Apoptose-Assay zu finden, der in dem Fall ein eher späteres Apoptosestadium detektieren konnte. Die Annexin V-Färbung, welche ein frühes Apoptosestadium charakterisiert, war in diesem Fall nicht geeignet. Die Apoptose-Messung mittels FACScan erfolgte relativ spät, nämlich 48 Stunden nach der Transfektion.

Für die Western Blot-Analyse wurden höhere TRAIL-Konzentrationen verwendet. Da die Zellen nach relativ kurzer Zeit geerntet wurden und lysiert wurden, konnte mit dieser hohen TRAIL-Konzentration eine schnellere Wirkung erzielt werden.

Unsere Experimente reproduzierten den Befund, dass TRAIL auf der Caspase-8-defizienten Neuroblastom-Zelllinie KELLY (Caspase-8-Verlust durch Promotor-Hypermethylierung, Fulda *et al.*, 2001) Proliferation induziert (Baader, *et al.*, 2005). Die Eigenschaft von TRAIL, auf TRAIL-resistenten Zelllinien Proliferation zu induzieren, war in meiner Arbeitsgruppe bereits 2003 beschrieben worden (Ehrhardt *et al.*). Jeremias *et. al.* (1998) beschrieben eine NF-κB-Aktivierung auf TRAIL-resistenten Tumorzelllinien. Bekannt ist, dass TRAIL nicht nur durch seine Todesrezeptoren TRAIL-R1 und –R2 Apoptose einleitet, sondern auch verschiedene nicht-apoptotische, proliferationsfördernde Signalwege aktiviert, wie JNK (Muhlenbeck, *et al.*, 1998), Akt/PKB, Erk-1/2 (Secchiero *et al.*, 2003), p38-MAP-Kinase (Weldon *et al.*, 2004) und eben auch NF-κB (Lin *et al.*, 2000). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ließen eine prominente Rolle des NF-κB-Signalwegs bei der TRAIL-vermittelten Proliferation vermuten, denn sowohl RIP-negative als auch IKK γ -negative JURKAT T-Zell Leukämie-Zellen zeigten keine Proliferation nach Stimulation mit TRAIL (Ehrhardt *et al.*, 2003). Des Weiteren war durch Transfektion mit der dominant negativen Mutante von IκB α eine Sensitivierung für TRAIL induzierte Apoptose beobachtet worden (Jeremias *et al.*, 1998). Die Arbeitsgruppe befasste sich in den letzten Jahren damit, den intrazellulären Signalweg der TRAIL-

vermittelten Proliferation in KELLY-Zellen zu identifizieren. Hierbei untersuchte sie mittels biochemischer Inhibitoren sowie per Western Blot- Analyse die genannten Proliferationswege. Die TRAIL-vermittelte Proliferation konnte mittels NF- κ B - Inhibitoren, wie z.B. SN50 und Transfektion mit NF- κ B-spezifischen Oligonukleotiden verhindert werden (unpublizierte Daten). Die von mir durchgef\u00fchrteten Western Blot- Analysen best\u00e4tigen die TRAIL-vermittelte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges auf KELLY-Zellen.

Auch in dem von mir durchgef\u00fchrten Transfektionsexperiment galt es, den NF- κ B- Signalweg zu inhibieren. Dazu wurde versucht, den Signalweg durch \u00d6berexpression des Inhibitors von NF- κ B, I κ B α , zu unterbrechen.

Die Ergebnisse dieser Experimente best\u00e4tigten die aufgestellten Hypothese: Die Zellen, die den NF- κ B-Inhibitor \u00d6berexprimierten, zeigten nach TRAIL-Stimulation Apoptose (15%) und kein erh\u00f6htes \u00d6berleben mehr. Inwiefern eine Inhibition des NF- κ B-Signalweges stets allein f\u00fcr die Sensitivierung f\u00fcr die TRAIL-induzierte Apoptose ausreicht, blieb noch umstritten. Nach Behandlung von Zellen des hepatozellul\u00e4ren Carcinoms mit Proteasominhibitoren, zeigten diese eine Sensitivierung gegen\u00f6ber TRAIL-induzierter Apoptose (Ganten *et al.* 2006). Die Inhibition des Proteasoms f\u00fchrt dazu, dass I κ B α nicht abgebaut wird und somit NF- κ B inaktiv im Zytosol bleibt. Anderen Arbeiten zufolge reicht das Ausschalten des NF- κ B- Signalweges allein nicht aus, um Zellen f\u00fcr TRAIL-induzierte Apoptose zu sensibilisieren (Anan *et al.*, 2006, Ganton *et al.*, 2005, Ishimura *et al.*, 2006). Bekannt ist, dass die meisten der f\u00fcr Zellwachstum und Proliferation verantwortlichen Proteine (NF- κ B und MAP-Kinasen) von TRAIL aktiviert werden und alle miteinander verflochten sind (Falschlehner *et al.*, 2007). Beispielsweise wurde beobachtet, dass die TRAIL- induzierte ERK-Aktivierung mit anti-apoptischen Effekten verbunden ist (Tan *et al.*, 2001, Soderstrom *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2006).

Die Rolle von NF- κ B f\u00fcr die TRAIL-vermittelte Proliferation muss noch auf einer zweiten Zelllinie verifiziert werden. Molek\u00eal konnte das Ph\u00e4nomen mittels eines stabilen, induzierbaren Systems der Expression von I κ B α noch deutlicher charakterisiert werden. Die tierexperimentelle Analyse ist essentiell, damit f\u00fcr einen zuk\u00f6nftigen Einsatz von TRAIL in der Therapie resistenter Tumoren die N\u00e4he zur

Applikationen von Inhibitoren des NF-κB Proliferationssignalwegs erfolgt, wie zum Beispiel dem klinisch eingesetzten Proteasomen-Inhibitor Bortezomib (Velcade®). Insgesamt zeigen meine Daten, dass TRAIL-vermittelte Proliferation in KELLY-Zellen von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB abhängt, was gut in den Kontext der publizierten Daten passt. TRAIL, welches effektiv Apoptose in Tumorzellen induziert und als zukünftiges Zytostatikum gilt, ist also in der Lage, einen zweiten, Apoptose-unabhängigen Signalweg in den Tumorzellen zu aktivieren, der über den Transkriptionsfaktor NF-κB zur vermehrten Proliferation von Tumorzellen führt. Da die Aktivierung dieses Signalweges während einer Tumortherapie mit TRAIL unerwünscht ist, sollte TRAIL im Rahmen von Polychemotherapie-Protokollen in der Nähe von NF-κB inhibierenden Substanzen eingesetzt werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit untersuchte ich, ob die Aktivierung anti-apoptotischer Prozesse in Tumorzellen ein einzigartiges Charakteristikum alleine von TRAIL ist oder ob auch andere pro-apoptotische Substanzen diese Eigenschaft teilen. Dazu untersuchte ich Zytostatika, die heute in der Klinik eingesetzt werden. In meinen Experimenten wurde versucht, ein breites Spektrum an Zytostatika zu testen. Dabei wurde Wert darauf gelegt, dass die Substanzen in Konzentrationen eingesetzt werden, die klinisch erreichbaren Werten entsprechen. Zu diesem Zweck wurden sie in der sogenannten Plasma-Spitzen-Konzentration eingesetzt, also in der Konzentration, die im Serum von behandelten Patienten maximal wirklich gemessen wurde. Zum anderen wurden vornehmlich Kombinationen von Zelllinie und Zytostatikum untersucht, die den klinischen Alltag widerspiegeln.

Die Behandlung der Ewing Sarkom-Zelllinie CADO mit Actinomycin D zeigte vermehrte Proliferation. Actinomycin D wird auch in der Therapie des Sarkoms eingesetzt (Euro-Ewing-99-Studie). 5-FU und Epirubicin führten zur Proliferation (Gruppe AP), auf der Mamma Cacinom-Zelllinie MCF-7 und sind ebenfalls Bestandteil der in der Klinik eingesetzten Chemotherapeutika (Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, 2008). Im Gegensatz dazu kann der proliferative Effekt von zum Beispiel 6-TG (Abb.12) auf der Ewing Sarkom-Zelllinie vernachlässigt werden, da diese Substanz ausschließlich in der Therapie von Leukämien eingesetzt wird.

Insgesamt zeigten die von mir durchgeführten Versuche, dass Zytostatika-induzierte Proliferation prinzipiell durch Substanzen aller Klassen und auf Tumorzellen aller Typen nachgewiesen werden kann.

Im Vergleich zu TRAIL ist bei der Behandlung mit den übrigen Zytostatika Proliferation häufiger in Form von AP als P zu beobachten.

An dieser Stelle ist ein weiterer kritischer Aspekt dieser unerwünschten Wirkung zu nennen: Wie bereits erwähnt wurden die Zytostatika in den Stimulationsexperimenten in Plasma-Spitzen-Konzentrationen und darunter liegenden Konzentrationen eingesetzt. Bei den Plasma-Spitzen-Konzentrationen handelt es sich um Konzentrationen, die im Serum von behandelten Patienten maximal gemessen wurden (Evans *et al.*, 1983; Hande *et al.* 1984; Mross *et al.*, 2000). Das bedeutet, dass diese Plasma-Spitzen-Konzentration nicht im Serum, also im Tumorgewebe aller Patienten erreicht wird. Einige Tumoren werden somit mit niedrigeren Zytostatika-Konzentrationen behandelt. Wenn man das häufige Auftreten von Proliferation im Sinne einer AP-Gruppe, was bedeutet, dass Zellen bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen proliferieren, bei hohen Dosen aber sterben, berücksichtigt, kann dieser Aspekt von unmittelbarer klinischer Relevanz sein. Denn in diesem Fall wird aus Gruppe AP im Tumor Gruppe P, d.h. der Tumor proliferiert, wenn die Plasma-Spitzen-Konzentration nicht erreicht wird. Daraus folgt, dass die unerwünschte Wirkung Proliferation im Sinne von Gruppe AP in-vivo wahrscheinlich häufiger als Proliferation im Sinne von Gruppe P auftritt.

Das Glukokortikoid Dexamethason nimmt eine Sonderrolle ein, da es als Zytostatikum lediglich in der Therapie von Leukämien eingesetzt wird. Im Rahmen der Therapie solider Tumoren wird es als Adjuvans zur Prophylaxe von Nausea und Vomitus verwendet (Hesketh, 2008). Dexamethason zeigte in unseren Stimulationsexperimenten am prominentesten Proliferation auf Zelllinien unterschiedlichen Ursprunges. Unsere Beobachtungen werden gestützt durch mehrere Arbeiten: Glucocortikoide führten zu einem besseren Überleben sowohl mehrerer nicht-transformierter (Furth *et al.*, 1999, Moran *et al.*, 2000) als auch transformierter Zelllinien (Mikosz *et al.*, 2001, Wu et. Al. 2004). Pang *et al.* (2006) zeigten im Tierexperiment Apoptose-antagonisierende Wirkungen von Dexamethason.

Unsere Arbeitsgruppe konnte die Dexamethason-induzierte Proliferation auch tierexperimentell bestätigen (unpublizierte Daten).

Grundsätzlich wird Chemotherapie als Gabe von verschiedenen Therapeutika als Polychemotherapie durchgeführt. Daher müssten alle Zytostatika, die in meiner Testung Proliferation induzierten, in Kombination mit den Zytostatika untersucht werden, die in der Klinik gemeinsam eingesetzt werden. Im Fall von Dexamethason, konnte die Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem DKFZ in Heidelberg (PD Dr. Amtmann) in-vivo zeigen, dass der proliferative Effekt von Dexamethason in Kombination mit Vincristin aufgehoben wurde.

Im Rahmen der Stimulationsexperimente mit primären, leukämischen Zellen konnte ich bei einigen wenigen Zytostatika eine moderate Verbesserung des Zellüberlebens durch das Zytostatikum zeigen, nämlich für Cyclophosphamid, Methotrexat, Vincristin und Dexamethason. Hierbei ist der Prozentsatz an Überlebens-fördernden Substanzen deutlich niedriger als in Zelllinien. Dies kann zum einen dadurch bedingt sein, dass Tumorzelllinien aufgrund der langen in-vitro Kultivierung eine Selektion von besonders aggressiven Tumorzellen darstellen. Auf der anderen Seite können jedoch auch bereits oben beschriebene technische Limitationen und kurze Inkubationszeiten dazu geführt haben, dass die Häufigkeit der Überlebensverlängerung durch Zytostatika auf primären Leukämiezellen unterschätzt wurde.

Um Überleben von Proliferation unterscheiden zu können, wurden auch von den primären Zellen Cellscreen-Aufnahmen erhoben. Die Daten zur Ermittlung von Proliferation liegen bereits vor, da für jede Probe, parallel zu der FACS- Analyse, Zellen auf Methylcellulose ausgesät und stimuliert wurden. Die Auswertung dieser Experimente erwies sich als aufwendig, und daher sind diese zur Zeit noch in Bearbeitung.

Zusammen genommen zeigen meine Daten, dass die neue unerwünschte Wirkung der Induktion von Proliferation auf Tumorzellen nicht auf TRAIL beschränkt ist, sondern ein generelles Problem darstellt, das Zytostatika aus allen Wirkklassen betrifft sowie Tumorzellen aller Tumortypen. Dies stellt die erste bekannte unerwünschte Wirkung von Zytostatika direkt auf die Zielzellen, nämlich die Tumorzellen selbst, dar, im Gegensatz zu den gut bekannten unerwünschten

Wirkungen der Zytostatika auf normale Zellen. Während in den letzten Jahren neben den hier dargestellten Daten viele Erkenntnisse zu den Mechanismen der anti-apoptotischen Wirkungen von TRAIL zusammengetragen wurden, ist der durch klinisch eingesetzte Zytostatika induzierte Phänotyp auf Tumorzellen noch unpubliziert und völlig neu. Meine Daten zeigen, dass es möglich ist, dass diese neue unerwünschte Wirkung klinisch relevant sein könnte. Weitere Studien sind notwendig, um diese unerwünschte Wirkung bezüglich ihrer Signalmechanismen und ihrer klinischen Relevanz zu verstehen und zu verhindern, dass Krebspatienten ungewollter Weise mit Substanzen behandelt werden, die das Wachstum ihrer Tumorzellen anregen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer neuen, noch wenig bekannten unerwünschten Wirkung von Substanzen, die in der Therapie von Tumoren eingesetzt werden: Klinisch eingesetzte Zytostatika sowie die neue Substanz TRAIL, welche sich in klinischen Phase I und II Studien befindet, fördern das Überleben von gewissen Tumorzellen und beschleunigen sogar deren Wachstum.

Diese vollkommen neue unerwünschte Wirkung wurde für TRAIL bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert. Hier war es jetzt meine Aufgabe, den intrazellulären Signalmechanismus der TRAIL-induzierten Proliferation zu charakterisieren. Durch Transfektion und Überexpression von inhibierendem Iκ-Bα konnte ich zeigen, dass TRAIL-induzierte Proliferation von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB abhängt und TRAIL bei Hemmung von NF-κB wieder in die Lage versetzt wird, Zelltod zu induzieren.

Des Weiteren untersuchte ich, ob TRAIL die einzige Zelltod-induzierende Substanz ist, die Proliferation in Tumorzellen auslösen kann oder ob dieses Charakteristikum von anderen Zytostatika geteilt wird. Meine Daten und unpublizierte Daten meiner Arbeitsgruppe zeigen, dass Zytostatika aus allen Wirkklassen grundsätzlich in der Lage sind, in gewissen Tumorzellen Proliferation zu induzieren. Ebenso sind Tumorzellen aller Tumortypen anfällig für Zytostatika-induzierte Proliferation. Daten an primären Zellen von Kindern mit akuter Leukämie zeigten jedoch, dass diese Nebenwirkung selten zu sein scheint.

Meine Daten legen nahe, dass es sich bei der neuen unerwünschten Wirkung der Zytostatika-induzierten Proliferation um ein seltenes, jedoch ubiquitäres Charakteristikum von Zytostatika handelt, das im Falle von TRAIL durch den Transkriptionsfaktor NF-κB vermittelt wird. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um in Zukunft zu verhindern, dass Krebspatienten mit Substanzen behandelt werden, die das Überleben oder das Wachstum ihrer Tumorzellen fördern.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Almasan, A. & Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 337-348 (2003).

Anan, A. et al. Proteasome inhibition induces hepatic stellate cell apoptosis. *Hepatology*, 335-344 (2006).

Arai, T. et al. Genomic organization and mutation analyses of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in colorectal carcinomas. *Cancer Lett.*, 197-204 (1998).

Ashkenazi, A. et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin Invest*, 155-162 (1999).

Baader, E. et al. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Proliferation of Tumor Cells with Receptor-Proximal Apoptosis Defects. *Cancer Research*, 7888-7895 (2005).

Bodmer, J. L., Meier, P., Tschopp, J. & Schneider, P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 20632-20637 (2000).

Bouralexis, S., Findlay, D. M. & Evdokiou, A. Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis*, 35-51 (2005).

Buchsbaum, D. J., Zhou, T. & Lobuglio, A. F. TRAIL receptor-targeted therapy. *Future Oncol.*, 493-508 (2006).

Chabner, B. A. & Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 65-72 (2005).

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.*, 205-210 (1993).

Chaudhary, P. M. et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.*, 821-830 (1997).

Chen, C., Edelstein, L. C. & Gelinas, C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell Biol.*, 2687-2695 (2000).

Chen, X., Kandasamy, K. & Srivastava, R. K. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res.*, 1059-1066 (2003).

Cooper, B. W. et al. A phase I and pharmacodynamic study of sequential topotecan and etoposide in patients with relapsed or refractory acute myelogenous and lymphoblastic leukaemia. *Leuk. Res.*, 35-44 (2003).

Cretney, E. et al. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J. Immunol.*, 1356-1361 (2002).

Degli-Esposti, M. A. et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.*, 1165-1170 (1997).

Di Pietro, R. & Zauli, G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J. Cell Physiol.*, 331-340 (2004).

Eggert, A. et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Med. Pediatr. Oncol.*, 603-607 (2000).

Ehrhardt, H. et al. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene*, 3842-3852 (2003).

Ehrhardt, H. et al. Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells. *Oncogene*, 783-793 (2007).

Emery, J. G. et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 14363-14367 (1998).

Estlin, E. J., Ronghe, M., Burke, G. A. & Yule, S. M. The clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase, anthracyclines and cyclophosphamide in relation to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 780-790 (2000).

Estlin, E. J., Yule, S. M. & Lewis, S. P. Consolidation therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside, epipodophyllotoxins and cyclophosphamide. *Cancer Treat. Rev.*, 339-350 (2001).

Evans, W. E. et al. Methotrexate cerebrospinal fluid and serum concentrations after intermediate-dose methotrexate infusion. *Clin Pharmacol. Ther.*, 301-307 (1983).

Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. & Walczak, H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1462-1475 (2007).

Fischer, U. & Schulze-Osthoff, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol. Rev.*, 187-215 (2005).

Fulda, S. et al. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*, 5865-5877 (2001).

Fulda, S. et al. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 1063-1075 (2001).

Fulda, S. & Debatin, K. M. Modulation of TRAIL signaling for cancer therapy. *Vitam. Horm.*, 275-290 (2004).

Furth, P. A. Introduction: mammary gland involution and apoptosis of mammary epithelial cells. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.*, 123-127 (1999).

Ganten, T. M. et al. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*, 588-597 (2005).

Ganten, T. M. et al. Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res*, 2640-2646 (2006).

Gilman, A. & Philips, F. S. The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. *Science*, 409-436 (1946).

Gilman, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am. J. Surg.*, 574-578 (1963).

Hande, K. R. et al. Pharmacokinetics of high-dose etoposide (VP-16-213) administered to cancer patients. *Cancer Res.*, 379-382 (1984).

Hassan, M. et al. A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients. *Br. J. Clin Pharmacol.*, 669-677 (1999).

Hayakawa, Y. et al. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J. Immunol.*, 123-129 (2004).

Herr, I. & Debatin, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 2603-2614 (2001).

Hesketh, P. J. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N. Engl. J. Med.*, 2482-2494 (2008).

Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module, *Oncogene*, 6706-6716 (2006).

Hymowitz, S. G. et al. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell*, 563-571 (1999).

Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S. F. & Gores, G. J. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol*, G129-G136 (2006).

Janssen, E. M. et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*, 88-93 (2005).

Jeremias, I. et al. Inhibition of Nuclear Factor kappa B Activation Attenuates Apoptosis Resistance in Lymphoid Cells. *Blood*, 4624-4631 (1998).

Jo, M. et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.*, 564-567 (2000).

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z. W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer*, 301-310 (2002).

Kaufmann, S. H. & Earnshaw, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.*, 42-49 (2000).

Kaufmann, S. H. & Steensma, D. P. On the TRAIL of a new therapy for leukaemia. *Leukemia*, 2195-2202 (2005).

Kimberley, F. C. & Screamton, G. R. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.*, 359-372 (2004).

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. & Wajant, H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signalling. *Mol. Cell Biol.*, 3964-3973 (2001).

Lamhamedi-Cherradi, S. E. et al. Transcriptional regulation of type I diabetes by NF-kappa B. *J. Immunol.*, 4886-4892 (2003).

Lawrence, D. et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.*, 383-385 (2001).

LeBlanc, H. N. & Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death. Differ.*, 66-75 (2003).

Lee, S. H. et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.*, 5683-5686 (1999).

Lee, T. J., Lee, J. T., Park, J. W. & Kwon, T. K. Acquired TRAIL resistance in human breast cancer cells are caused by the sustained cFLIP(L) and XIAP protein levels and ERK activation *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 1024-1030 (2006).

Leverkus, M. et al. Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol. Cell Biol.*, 777-790 (2003).

Liabakk, N. B. et al. Development, characterization and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA. *J. Immunol. Methods*, 119-128 (2002).

Lin, Y. et al. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.*, 6638-6645 (2000).

Lowe, E. S. et al. 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.*, 199-205 (2001).

Lewis, S. P., Pearson, A. D., Newell, D. R. & Cole, M. Etoposide pharmacokinetics in children: the development and prospective validation of a dosing equation. *Cancer Res*, 4881-4889 (1993).

Lunardi, G. et al. Influence of trastuzumab on epirubicin pharmacokinetics in metastatic breast cancer patients. *Ann. Oncol.*, 1222-1226 (2003).

MacFarlane, M. et al. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 25417-25420 (1997).

Mariani, S. M. & Krammer, P. H. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.*, 973-982 (1998).

Marsters, S. A. et al. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.*, 1003-1006 (1997).

Mikosz, C. A., Brickley, D. R., Sharkey, M. S., Moran, T. W. & Conzen, S. D. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. *J. Biol. Chem.*, 16649-16654 (2001).

Moran, T. J., Gray, S., Mikosz, C. A. & Conzen, S. D. The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 867-872 (2000).

Mross, K., Hollander, N., Hauns, B., Schumacher, M. & Maier-Lenz, H. The pharmacokinetics of a 1-h paclitaxel infusion. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 463-470 (2000).

Muhlenbeck, F. et al. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.*, 33091-33098 (1998).

Nagane, M. et al. 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.*, 847-853 (2000).

Nitsch, R. et al. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*, 827-828 (2000).

Ogasawara, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 806-809 (1993).

Pai, S. I. et al. Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res.*, 3513-3518 (1998).

Pan, G. et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 815-818 (1997).

Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F. & Dixit, V. M. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.*, 41-45 (1998).

Pang, D., Kocherginsky, M., Krausz, T., Kim, S. Y. & Conzen, S. D. Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. *Cancer Biol. Ther.*, 933-940 (2006).

Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 49-62 (2007).

Pitti, R. M. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.*, 12687-12690 (1996).

Ravi, R. et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell Biol.*, 409-416 (2001).

Ravi, R. & Bedi, A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. *Drug Resist. Updat.*, 53-67 (2004).

Roux, P. P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 320-344 (2004).

Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature*, 294-297 (2004).

Secchiero, P. et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation*, 2250-2256 (2003).

Secchiero, P. et al. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood*, 517-522 (2004).

Skalski, V., Rivas, J., Panasci, L., McQuillan, A. & Feindel, W. The cytotoxicity of sarcosinamide chloroethylnitrosourea (SarCNU) and BCNU in primary gliomas and glioma cell lines: analysis of data in reference to theoretical peak plasma concentrations in man. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 137-140 (1988).

Smyth, M. J. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J. Exp. Med.*, 661-670 (2001).

Smyth, M. J. et al. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity.*, 1-6 (2003).

Soderstrom, T. S., Poukkula, M., Holmstrom, T. H., Heiskanen, K. M. & Eriksson, J. E. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J. Immunol.*, 2851-2860 (2002).

Srivastava, R. K. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia.*, 535-546 (2001).

Takeda, K. et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.*, 94-100 (2001).

Tartaglia, L. A. & Goeddel, D. V. Two TNF receptors. *Immunol. Today*, 151-153 (1992).

Tirode, F. et al. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell*, 421-429 (2007).

Tran, S. E., Holmstrom, T. H., Ahonen, M., Kahari, V. M. & Eriksson, J. E. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.*, 16484-16490 (2001).

Tran, S. E., Holmstrom, T. H., Ahonen, M., Kahari, V. M. & Eriksson, J. E. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.*, 16484-16490 (2001).

Trauzold, A. et al. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 7434-7439 (2006).

Urien, S. et al. Modelling of 5-fluorouracil pharmacokinetics following oral UFT administration. A population study in 30 patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 99-107 (2003).

Veal, G. J. et al. Pharmacokinetics of Dactinomycin in a Pediatric Patient Population: a United Kingdom Children's Cancer Study Group Study. *Clinical Cancer Research*, 5893-5899 (2005).

Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis.*, 449-459 (2002).

Wajant, H. TRAIL and NF κ B signaling--a complex relationship. *Vitam. Horm.*, 101-132 (2004).

Walczak, H. et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, 5386-5397 (1997).

Walczak, H. et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.*, 157-163 (1999).

Walczak, H. & Krammer, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.*, 58-66 (2000).

Wang, S. & El-Deiry, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 8628-8633 (2003).

Weldon, C. B. et al. Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signalling. *Int. J. Oncol.*, 1473-1480 (2004).

Wen, J. et al. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood*, 3900-3906 (2000).

Wiley, S. R. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.*, 673-682 (1995).

Wu, G. S. et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.*, 141-143 (1997).

Zamai, L. et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*, 3716-3724 (2000).

Zhang, X. D., Borrow, J. M., Zhang, X. Y., Nguyen, T. & Hersey, P. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene*, 2869-2881 (2003).

Dkfz.de:

<http://www.krebsinformation.de/themen/grundlagen/neue-verfahren-krebsforschung.php>, 17.08.2008

Euro-Ewing-99-Studie:

<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/033-039.htm>, 05.07.2008

Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, 2008:

http://www.ago-online.org/index.php?lang=de&site=mamma_guide_08_1_1&topic=mamma_guide,
07.07.2008

9 DANKSAGUNG

Meiner Doktormutter, Frau PD Dr. med. Irmela Jeremias, danke ich für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung während der ganzen Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Ines Höfig und Michaela Grunert für ihre kompetente Beantwortung sehr vieler Fragen.

Auch bedanke ich mich bei Sibylle Gündisch und allen anderen Mitarbeitern der AG Jeremias für ihre stete Hilfsbereitschaft und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Bei Sara Brittingham bedanke ich mich für die vielen Nächte, die wir gemeinsam im Labor experimentierend verbracht haben.

Meinen Eltern sowie Christel und Jochem Nover möchte ich für ihre Unterstützung und Ermutigung sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus danken.