

**Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen  
Abteilung Radioonkologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg**

**Apoptoseinduktion in Lymphomzellen  
durch TRAIL und Bestrahlung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Angeliki Anastasakis**

**aus**

**Athen**

**2005**

Dekan: Prof.	Dr. Claus D. Claussen
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. C. Belka
2. Berichterstatter:	Professor Dr. C. F. Poets

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Vorwort .....	1
1 Einleitung	
1.1 Bedeutung der Strahlentherapie .....	3
1.2 Wirkung ionisierender Strahlung .....	3
1.3 Zelltod .....	5
1.4 Mechanismen der Apoptose .....	7
1.4.1 Erste Erkenntnisse .....	7
1.4.2 Die „Exekutoren der Apoptose“: Die Caspasen .....	8
1.4.3 Das Bcl-2 Protein .....	13
1.5 Die zwei Wege der Apoptose .....	15
1.5.1 Die Zellstress-vermittelte Apoptose .....	15
1.5.2 Die Zelltodrezeptor-vermittelte Apoptose .....	17
1.5.2.1 Der CD95 (APO-1/Fas) Rezeptor .....	18
1.5.2.2 Das TRAIL-Rezeptor-System .....	20
1.6 Themenstellung .....	23
2 Material	
2.1 Zelllinien .....	24
2.2 Geräte .....	25
2.3 Verbrauchsmaterial .....	25
2.4 Chemikalien .....	26
2.5 Puffer und Lösungen .....	27
2.6 Antikörper und Liganden .....	29

---

3	Methoden	
3.1	Zellkultur	30
3.2	Einfrieren / Auftauen der Zellen	30
3.3	Bestrahlung	30
3.4	Messung des Zelltodes mittels Durchflusszytometrie	31
3.4.1	Die Durchflusszytometrie	31
3.4.2	Messung des mitochondrialen Membranpotentials	32
3.4.3	TRAIL-R1/R2-Oberflächenexpression	32
3.5	Nachweis der Caspasenaktivität mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot	33
3.5.1	Bestimmung der Zellzahl	33
3.5.2	Herstellung der Zellysate	33
3.5.3	Proteinbestimmung	34
3.5.4	Probenvorbereitung	34
3.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	34
3.5.6	Westernblot-Verfahren	36
4	Ergebnisse	
4.1	TRAIL-R1- und -R2-Oberflächenexpression	39
4.2	Nachweis von FADD, Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-3 im Westernblot	42
4.3	Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung in Lymphomzellen	43
4.4	Apoptoseinduktion durch TRAIL in Lymphomzellen	46
4.5	PARP-Aktivierung durch ionisierende Strahlung in Lymphomzellen	48
4.6	PARP-Aktivierung durch TRAIL in Lymphomzellen	49
4.7	Kombinationswirkung von ionisierender Strahlung und TRAIL in Lymphomzellen	50

5	Diskussion.....	56
5.1	Wirkungsweise von TRAIL.....	57
5.2	Veränderungen der TRAIL-Sensibilität.....	62
5.3	Veränderungen der Sensibilität auf Bestrahlung.....	64
5.4	Klinische Bedeutung der Wirkung von TRAIL, Bestrahlung und der Kombination beider Behandlungsmethoden.....	64
6	Zusammenfassung.....	67
7	Literaturverzeichnis.....	X
	Danksagung.....	XIX
	Lebenslauf.....	XX

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die drei Pfeiler der onkologischen Therapie .....	1
Abbildung 2: Wege des Zelltodes bei C. elegans und Säugetier .....	8
Abbildung 3: Proteolytische Aktivierung der Caspase-1 .....	9
Abbildung 4: Erkennungssequenzen in Caspasen .....	10
Abbildung 5: Struktur der Bcl-2 Proteine .....	14
Abbildung 6: Der mitochondriale Apoptoseweg .....	16
Abbildung 7: Struktur der Todesrezeptoren .....	17
Abbildung 8: Modell der beiden CD95-Signalwege .....	19
Abbildung 9: Die vier verschiedenen TRAIL-Rezeptoren .....	21
Abbildung 10: Modell der beiden Apoptosewege .....	22
Abbildung 11: Aufbau einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen .....	36
Abbildung 12: Aufbau eines Westernblots .....	37
Abbildung 13: Die Nachweisreaktion im Westernblot-Verfahren .....	38
Abbildung 14: Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptor R1 und R2 .....	41
Abbildung 15: Westernblotanalyse der Zelllinien 207, C698, DOHH-2, CMLT-1, KARPAS-299 und U937 für die Grundrate der Expressi- on für FADD, Caspase-8 und Caspase-3 .....	43
Abbildung 16: Zwei exemplarische Dotplots .....	44
Abbildung 17: Zeitabhängige Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung mit 10 Gray in Lymphomzellen .....	45
Abbildung 18: zeitabhängige TRAIL-induzierte Apoptose in Lymphomzellen .....	47
Abbildung 19: Aktivierung von PARP durch Bestrahlung mit 10 Gy in Lymphom- zellen .....	48
Abbildung 20: Aktivierung von PARP durch Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL .....	49
Abbildung 21: Apoptoseinduktion in Lymphomzellen durch simultane Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy im Durchflusszytometer gemessen .....	51
Abbildung 22: Apoptoseinduktion in Lymphomzellen durch simultane Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy .....	52

Abbildung 23: Apoptoserate in verschiedenen Lymphomzelllinien nach Bestrahlung mit 10 Gy bzw. nach Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL.....	54
Abbildung 24: Simultane Stimulation der Lymphomzellen mit 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy Bestrahlung.....	55
Abbildung 25: Modell der beiden Apoptosewege.....	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abgrenzung Nekrose zu Apoptose .....	6
Tabelle 2: Homologe Komponenten des apoptotischen Programms in C. elegans und Säugetier .....	8
Tabelle 3: Caspasen-Substrate .....	12
Tabelle 4: Zusammensetzung der Westernblot-Gele .....	35
Tabelle 5: Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptor R1 und R2 .....	41
Tabelle 6: Effekt der simultanen Kombinationsbehandlung in Lymphomzellen .....	53

## Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> mpère
AICD	<u>A</u> ktivierungs- <u>i</u> nduzierter Zelltod
AIF	<u>A</u> poptose <u>i</u> nduzierender <u>F</u> aktor
ALL	<u>A</u> kute <u>l</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
Ak	<u>A</u> ntikörper
ANT	„ <u>a</u> denine <u>n</u> ucleotide <u>t</u> ranslocator“
AP	<u>a</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
Apaf-1	„ <u>a</u> poptotic <u>p</u> rotease- <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor <u>1</u> “
APS	<u>A</u> mmoniumperoxiddisulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
Bcl-2	<u>B</u> - <u>c</u> ell- <u>l</u> ymphoma/ <u>l</u> eucemia- <u>2</u>
Bid	„ <u>B</u> H <u>3</u> <u>i</u> nteracting domain <u>d</u> eath agonist“
CARD	„ <u>c</u> aspase <u>r</u> ecruitment <u>d</u> omain“
CD	„ <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation“
CD95-L = FasL	<u>CD95</u> - <u>L</u> igand = <u>F</u> as- <u>L</u> igand
ced	„ <u>C</u> aenorhabditis <u>e</u> legans cell <u>d</u> eath gene“
C. elegans	<u>C</u> aenorhabditis <u>e</u> legans
CML	<u>C</u> hronisch <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
D	<u>D</u> alton
D	Asparaginsäure
DcR	„ <u>d</u> eco <u>y</u> <u>r</u> eceptor“
DD	„ <u>d</u> eath <u>d</u> omain“
DED	„ <u>d</u> eath <u>e</u> ffector <u>d</u> omain“
dest.	<u>d</u> estilliert
DFF	<u>D</u> NA <u>f</u> ragmentation <u>f</u> actor
DISC	„ <u>d</u> eath <u>i</u> nducing <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex“
DMSO	<u>D</u> imethylsulf <u>o</u> xid
DNA	<u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleid <u>a</u> cid

---

DR	„ <u>d</u> eath <u>r</u> eceptor“
dt.	<u>d</u> eutsch
E	Glutaminsäure
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> cet <u>a</u> t
FACS	„ <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> can“ = Durchflusszytometer
FADD	„ <u>f</u> as- <u>a</u> ssociating protein with <u>d</u> eath <u>d</u> omain“
Fas-R = CD95	<u>F</u> as- <u>R</u> ezeptor
FasL = CD95L	<u>F</u> as- <u>L</u> igand = <u>CD95</u> - <u>L</u> igand
FCS	„ <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum“ = Fetales Kalbserum
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>i</u> sothi <u>c</u> yanat
FLICE	„ <u>F</u> as-associated death domain- <u>l</u> ike <u>I</u> L-1- <u>c</u> onverting- <u>e</u> nz <u>y</u> m“
FLIP's	„ <u>F</u> LICE- <u>i</u> nhibitory- <u>p</u> roteins“
FSC	„ <u>F</u> orward light <u>S</u> catter“
5-FU	<u>5</u> - <u>F</u> luoruracil
gg.	<u>g</u> egen
Gy	<u>G</u> ray
HEPES	2-[4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1- <u>p</u> iperaziny]- <u>e</u> thansulfonsäure
IAP	„ <u>i</u> nhibitor of <u>a</u> poptosis <u>p</u> roteins“
ICE	<u>I</u> nterleukin-1 $\beta$ - <u>c</u> onverting <u>e</u> nz <u>y</u> me
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL	<u>I</u> nterleukin
JNK	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminale <u>K</u> inase
kDa	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
L	<u>L</u> eucin
mA	<u>m</u> illi- <u>A</u> mpère
ml	<u>M</u> illiliter
$\mu$ g	<u>M</u> ikrogramm
monokl.	<u>monoklonal</u>

MV	<u>M</u> egavolt
mRNA	<u>m</u> essenger- <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleid <u>a</u> cid
NAK	<u>N</u> F-kappaB- <u>a</u> ctivating <u>k</u> inase
NF $\kappa$ B	„ <u>n</u> uclear <u>f</u> actor of <u><math>\kappa</math>B</u> “
NGF	„ <u>n</u> erve <u>g</u> rowth <u>f</u> actor“
OPG	<u>O</u> steoprotegin
PARP	<u>p</u> oly-( <u>A</u> DH- <u>r</u> ibose) <u>p</u> olymerase
PT-Pore	„ <u>T</u> ransition <u>P</u> ore“
RT	„ <u>R</u> adiation“ = Bestrahlung)
SAPK	„ <u>s</u> tress- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase“
SDS	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulfat
SSC	<u>S</u> ide <u>S</u> catter
TEMED	N,N,N',N' - <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
TM	<u>T</u> ransmembranregion
TMRE	<u>T</u> etramethylrhodaminmethylester
TNF	„ <u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor“
TRADD	„ <u>T</u> NF- <u>R</u> 1- <u>a</u> ssociated <u>d</u> eath <u>d</u> omain protein“
TRAF	„ <u>T</u> umor necrosis factor <u>r</u> eceptor- <u>a</u> ssociated <u>f</u> actor“
TRAIL	„ <u>T</u> NF- <u>r</u> elated <u>a</u> ptosis <u>i</u> nducing <u>l</u> igand“
TRAIL-R	<u>T</u> RAIL- <u>R</u> ezeptor
U	<u>U</u> nit
UV	<u>u</u> ltraviolett
V	<u>V</u> alin
VDAC	„ <u>v</u> oltage- <u>d</u> ependent <u>a</u> nion <u>c</u> hannel“
W	Tryptophan

## Vorwort

Bösartige Tumore sind nach Kreislauferkrankungen heutzutage die zweithäufigste Todesursache mit zunehmender Inzidenz. Bei Kindern ist die Leukämie mit 45 % die häufigste bösartige Erkrankung.

Die drei Säulen der Krebstherapie stellen die Chirurgie, die Strahlentherapie und die Chemotherapie dar. Durch die optimale Kombination sind heute ungefähr 45% aller Tumorerkrankungen heilbar. In den restlichen Fällen ist entweder die Erkrankung primär metastasiert, lässt sich lokal nicht kontrollieren oder metastasiert sekundär.

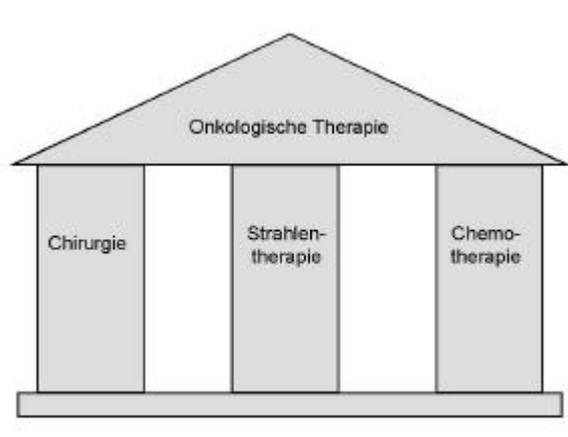


Abbildung 1: **Die drei Pfeiler der onkologischen Therapie**

Die Effizienz der Strahlentherapie als bedeutendes Instrument für die lokale und lokoregionäre Kontrolle ist im wesentlichen durch die Toleranz der Normalgewebe und durch intrinsische Radioresistenzen limitiert. Deshalb ist es wichtig, neue Therapieansätze zu entwickeln, um die Resistenzen zu überwinden ohne die Nebenwirkungsrate zu erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine Bestrahlungstherapie durch Kombination mit einer proapoptotischen Signalsubstanz namens TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing ligand) effektiver bei der Kontrolle von Lymphom- und Leukämiezellen in vitro wird (siehe Kapitel 4).

Eine neue Behandlungsform bestehend aus Bestrahlung kombiniert mit TRAIL oder eine alleinige TRAIL-Anwendung könnte bei guter Verträglichkeit zu einer höheren Remissionsrate oder gar zu optimierten Heilungserfolgen bei den Betroffenen führen.

Der Einsatz von TRAIL erscheint besonders vielversprechend, da TRAIL eine hohe Tumorzellspezifität hat und somit in Kombination mit Bestrahlung eine Reduktion der erforderlichen Strahlendosen vermitteln oder bei gleicher Dosis zu einer besseren Tumorkontrolle führen könnte.

## **1. Einleitung**

### **1.1 Bedeutung der Strahlentherapie**

Strahlentherapeutische Verfahren sind an ca. 40 % der Tumorheilungen beteiligt, dabei sind ca. 10 % auf eine alleinige Radiatio zurückzuführen. Grundsätzlich versucht man im Rahmen der Strahlentherapie geringe Unterschiede der Strahlensensitivität zwischen Tumor- und Normalgewebe zu nutzen, um einen Therapieeffekt zu erzielen. <sup>(1),(2)</sup>

Optimalerweise ist das Tumorgewebe strahlensensibler als das gesunde Gewebe. Man kann die Strahlensensibilität des Tumorgewebes erhöhen: durch Temperaturerhöhung, Oxygenierung oder durch chemische Sensitizer (Cisplatin, 5-FU). Eine Erhöhung der Strahlendosis im Tumor kann durch verschiedene Behandlungsgeometrien (interne, externe Bestrahlung; Strahlung unterschiedlicher Reichweite, Eindringtiefe und Strahlenqualität; Verwendung beweglicher oder fixer Strahlenquellen; Variabilität der zeitlichen Dosisverteilung) erzielt werden.

Leider sind der Strahlentherapie durch intrinsische Radioresistenzen und durch dosisabhängige Nebenwirkungen wie insbesondere Fibrose und Gewebsatrophien Grenzen gesetzt.

### **1.2 Wirkung ionisierender Strahlung**

Im Bereich der Strahlentherapie werden hauptsächlich hochenergetische Röntgenstrahlen verwendet, deren Charakteristikum ist, dass sie bei Interaktion mit Materie zu Ionisierungsprozessen führen. Daher leitet sich die Bezeichnung ionisierende Strahlung ab. Global können drei subsequente Prozesse bei der Interaktion von Strahlung mit biologischen Systemen abgegrenzt werden: <sup>(3)</sup>

### a) Physikalischer Vorgang (Primärprozess):

Bei allen Strahlenformen erfolgt eine Energieübertragung auf Materie. Dieser rein physikalische Vorgang ist für alle Strahlenwirkungen verantwortlich.

Direkt ionisierende Strahlung besteht aus geladenen Teilchen ( $\alpha$ ,  $\beta^+$ ,  $\beta^-$ , Elektronen, Protonen), die aufgrund ihrer Ladung beim Durchgang durch Materie direkt mit den Atomen in Wechselwirkung treten.

Die energiereichen Teilchen treffen auf Materie, werden abgebremst und es erfolgt eine Energieabgabe über Ionisierungs- oder Anregungsprozesse.

Indirekt ionisierende Strahlung besteht aus Neutronen oder Photonen (Gammastrahlung, Röntgenstrahlung), die wegen ihrer fehlenden Ladung nicht direkt mit den Atomen in Wechselwirkung treten können. Die Ionisierung erfolgt über die Bildung geladener Sekundärteilchen.

Bei der Ionisierung wird ein Elektron aus dem Atomverband losgelöst und aus einem neutralen Molekül entsteht ein geladenes Teilchen. Dabei entspricht ein Gray  $10^5$  Ionisationsvorgängen.<sup>(4)</sup>

### b) Chemischer Prozess:

Durch die oben beschriebenen Ionisations- und Anregungsprozesse ändern sich die Energieverhältnisse innerhalb eines Moleküls, so dass es dissoziiert. Die Bruchstücke bestehen aus ungepaarten Elektronen (freie Radikale) und sind sehr reaktionsfreudig. Die Radikale, die Ionen und die angeregten Atome reagieren chemisch untereinander und mit ihrer Umgebung.<sup>(3)</sup>

- Bei direkter Strahlenwirkung erfolgt eine Zerstörung biologischer Moleküle selbst (DNA-Kettenbrüche usw., siehe Punkt c).
- Bei indirekter Strahlenwirkung entstehen Radikale infolge Radiolyse des Wassers, aus dem die Zelle überwiegend besteht, also  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und atomarer Wasserstoff. Diese reagieren untereinander und es entstehen unter anderem  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{HO}_2^\cdot$ . Diese Verbindungen, die Ionen und die angeregten Atome können chemische Veränderungen in ihrer Umgebung auslösen, die in biochemi-

sche Stoffwechselprozesse eingreifen. Somit ist ein hoher Sauerstoff- und Wassergehalt der Zelle für die indirekte Strahlenwirkung von großer Bedeutung. Alle diese Vorgänge erfolgen innerhalb weniger Millisekunden, bis man aber mikro- oder makroskopisch die Schäden der folgenden biologischen Phase erkennt, können Wochen bis Jahrzehnte vergehen.

### c) Biologische Phase.<sup>(3)</sup>

Es kommt zur Schädigung der Zellmembran, von Enzymen oder der DNA (Doppelstrangbrüche (irreparabel) und Einzelstrangbrüche durch Spaltung der Phosphatesterbindungen, Basenfreisetzung durch Spaltung von Zucker-Basen-Bindungen, Basenfehlpaarungen, Basendefekte durch Desaminierung und Oxidierung des Pyrimidinringes und Spaltung des Purinringes, Vernetzung von Ketten durch Bildung intra- und intermolekularer Bindungen). Ein Gray führt zu 1000 Einzelstrangbrüchen, 40 Doppelstrangbrüchen und zu über 1000 Basendefekten.<sup>(3)</sup> Sind die Schäden zu groß, versagen die zellulären Reparaturmechanismen und es kommt zum Zelltod oder zur malignen Transformation.

## **1.3 Zelltod**

Bei der Analyse von Zelltodvorgängen können grobvereinfacht zwei Formen des Zelltodes abgegrenzt werden: Nekrose und Apoptose.

Beide lassen sich in ihren Reinformen anhand biochemischer und morphologischer Kriterien voneinander unterscheiden.

Nekrose stellt morphologische Veränderungen einer Zelle nach irreversiblen Ausfall der Zellfunktionen dar.

Sie tritt bei starker Schädigung (Hyperthermie, Komplementaktivierung, Hypoxie) einer Zelle auf und führt somit zum unphysiologischen und passiven Tod der Zelle.

Erst 1970 beschrieben Wyllie und Kerr die Existenz einer weiteren Form des Todes menschlicher Zellen neben der Nekrose: die Apoptose.<sup>(3)</sup> Der Begriff Apoptose ist griechischen Ursprungs und beschreibt das Abfallen der Blätter von den

Bäumen. Häufig wird er synonym zum Begriff des programmierten Zelltodes verwendet. Schlüsselcharakteristikum von programmierten Zelltodvorgängen oder Apoptoseprozessen ist die Tatsache, dass diese Prozesse koordiniert und aktiv reguliert ablaufen (für weitere Unterscheidungsmerkmale: siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: **Abgrenzung Nekrose<sup>(6)</sup> zu Apoptose<sup>(6),(7)</sup>**

<b>Nekrose</b>		<b>Apoptose</b>
nicht regulierter Zelluntergang		physiologischer Zelltod
freigesetzte Zellbestandteile führen zur Entzündungsreaktion ⇒ Gewebsschädigung		regulierter Untergang ganz bestimmter Zellen ohne Entzündungsreaktion
erfolgt passiv ohne Energieverbrauch		erfolgt aktiv unter ATP-Verbrauch
Anschwellen der Zelle		Zellschrumpfung
Zellkernveränderungen (Pyknose, Karyorrhexis, Karyolyse)		Chromatinkondensation, apoptotic bodies
Chromatinverlust		
vollständige Lyse		Bildung von Vesikeln (apoptotic bodies); an der Zelloberfläche entstehen Membranausstülpungen (Blebbing)
postlytische DNA-Fragmentierung		geregelte DNA-Fragmentierung ⇒ DNA-Banden im Agarosegel
Zerstörung der Zellmembran		Phagozytose der „apoptotic bodies“ nach Sekretion von LPC und Phosphatidylserin-Exposition auf der Zelloberfläche (Lauber et al. Cell 2003)

Die Bedeutung von aktiven Zelltodprozessen wird klar, wenn man sie im Zusammenhang mit der Regulation der Gewebshomöostase sieht. Diese wird nämlich durch ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellproliferation aufrechterhalten.<sup>(8)</sup> Somit führt Apoptose zur gezielten Beseitigung überschüssiger Zellen, zum Beispiel bei der Ausbildung der Phalangen durch die Elimination des Interphalangealgewebes bei der Embryogenese, bei der Hämatopoese<sup>(9),(10)</sup>, beim Untergang autoreaktiver Lymphozyten<sup>(11)</sup> oder bei der kontinuierlichen Gewebserneuerung. Auch geschädigte Zellen werden entfernt, bevor sie maligne entarten. Kön-

nen sich Zellen diesen Mechanismen entziehen, können folglich Tumoren entstehen.<sup>(12)</sup>

Zusammengefasst erfolgt Apoptose somit nach Zellschäden, Entzug von Wachstumsfaktoren, im Rahmen programmierter Embryogenesesequenzen oder durch aktive Stimulation von sogenannten Zelltodrezeptoren.<sup>(13)</sup>

## **1.4 Mechanismen der Apoptose**

### **1.4.1 Erste Erkenntnisse**

Zahlreiche Versuche zur Identifizierung der Komponenten des apoptotischen Programms wurden an der Nematode *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. Im Rahmen der Embryogenese werden prädefiniert 128 Zellen apoptotisch deletiert. Die Untersuchung von Mutanten, bei denen dieser Prozess gestört war, führte zur Entdeckung von drei essentiellen Genen: Die pro-apoptotischen Gene *ced-3*<sup>(14)</sup> und *ced-4*,<sup>(15)</sup> die notwendig für die Apoptose sind, und das anti-apoptotische Gen *ced-9*<sup>(16)</sup> (*C*aenorhabditis *e*legans *c*ell *d*eath gene), das den Zelltod verhindert. Eine inaktivierende Mutation von *ced-9* führt zu inadäquatem Zelluntergang, während eine Überexpression von *ced-3* und *ced-4* zur Apoptose führt. Man fand heraus, dass *ced-9* direkt an *ced-4* bindet und es inaktiviert.<sup>(17)</sup>

Bei der Untersuchung von Säugetierzellen entdeckte man homologe Gene bzw. Proteine zu den *ced*-Genen: *ced-3* entspricht weitgehend dem <sup>(12)</sup> Interleukin-1- $\beta$ -converting-enzyme (ICE)<sup>(12)</sup>, *ced-4* entspricht Apaf-1<sup>(18)</sup> und *ced-9* den bcl-Proteinen<sup>(19),(20)</sup> beim Säugetier.

Tabelle 2: **Homologe Komponenten des apoptotischen Programms in *C. elegans* und Säugetier**

	<i>C. elegans</i>	Säugetier
pro-apoptotisch	ced-3 ced-4	ICE-Protease Apaf-1
anti-apoptotisch	ced-9	Bcl-2-Proteine

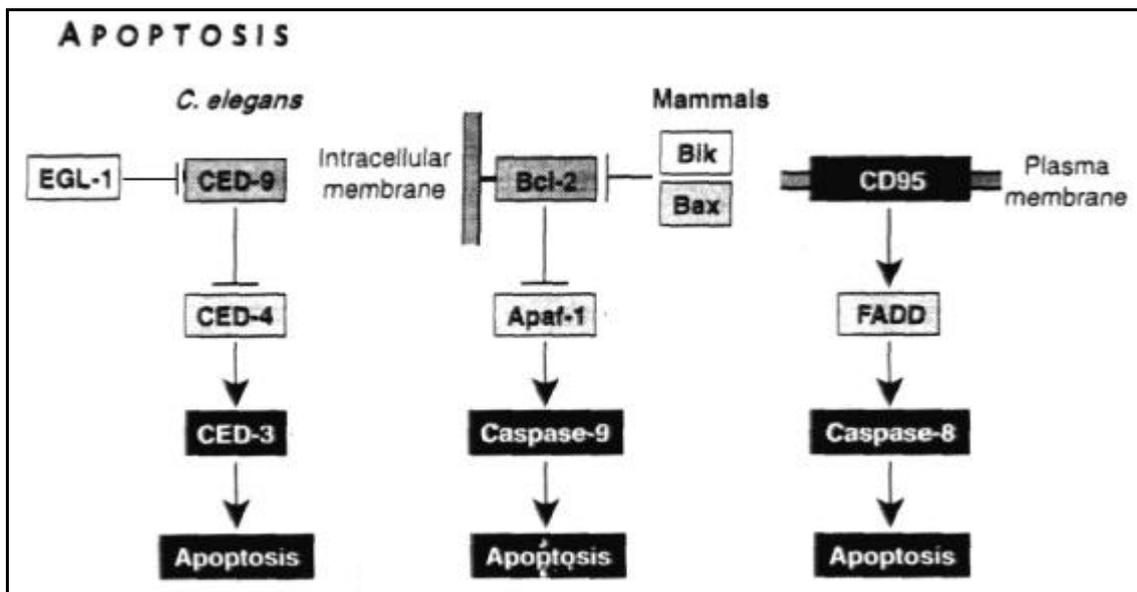


Abbildung 2: **Wege des Zelltodes bei *C. elegans* und Säugetier** (nach Adams et al. 1998)

### 1.4.2 Die „Exekutoren der Apoptose“: Die Caspasen

Nach Identifikation der ICE-Protease war schnell klar, dass bei Menschen eine Familie gleichartiger Enzyme existiert. Diese wurden in der Folge Caspasen genannt („cystein proteases with aspartate specificity“).

Die Caspasen stellen einen entscheidenden Bestandteil der Zelltodmaschinerie dar. Die bislang zwölf bekannten Caspasen sind entweder an der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine beteiligt oder an der Initiierung und Ausführung der Apoptose.<sup>(21)</sup>

Caspasen werden als inaktive Vorstufe, ein Proenzym, gebildet. Dieses besteht aus einer unterschiedlich langen aminoterminalen Prodomäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung.<sup>(22)</sup> Jede Caspase enthält eine QACXG-Pentapeptidsequenz, die den aktiven Teil umgibt. Am C-Terminus erfolgt die Spaltung zur Aktivierung (siehe Abbildung 4).<sup>(23)</sup>

Die drei Domänen werden durch diese Spaltung an spezifischen Aspartat-resten getrennt und es entsteht ein Heterodimer aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Zwei dieser Heterodimere lagern sich zu einem Tetramer zusammen, eine aktive Caspase ist entstanden.<sup>(24)</sup>

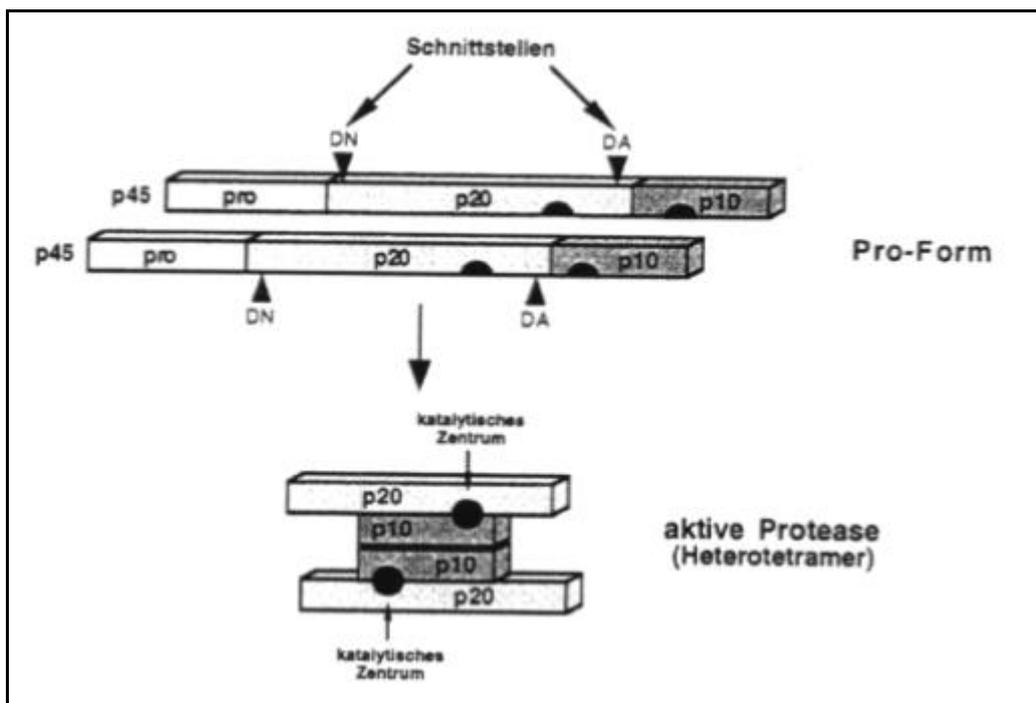


Abbildung 3: **Proteolytische Aktivierung der Caspase-1**

Durch Abspaltung der Prodomäne entsteht die aktive Caspase, bestehend aus zwei großen und kleinen Untereinheiten (nach Schulze-Osthoff et al., 1998)

Eine aktive Caspase enthält in ihrem aktiven Zentrum Cystein und spaltet ihre Substrate (Caspasen eingeschlossen) carboxyterminal an einem Aspartatrest.

Dass Caspasen trotzdem unterschiedliche Substrate haben, liegt an der aus vier Aminosäuren bestehenden Erkennungssequenz -XXXD-aminoterminal zur Spaltstelle.<sup>(25)</sup>

Aufgrund der unterschiedlichen Erkennungssequenzen kann man die Caspasen in drei Gruppen einteilen:<sup>(26)</sup>

- Caspase-1, -4 und -5 mit der Erkennungssequenz -WEXD-
- Caspase-2, -3 und -7 mit der Erkennungssequenz -(D/I)EXD-
- Caspase-6, -8 und -9 mit der Erkennungssequenz -(T/V/P)EXD-

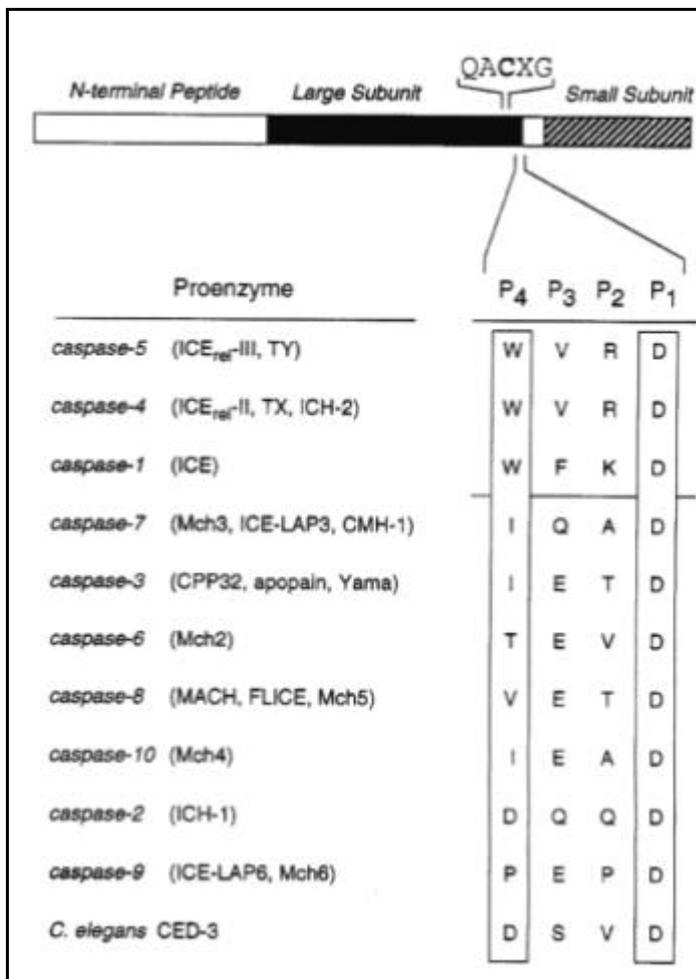


Abbildung 4: **Erkennungssequenzen in Caspasen**

Der erste Schritt zur Aktivierung der Caspasen erfolgt durch eine Spaltung am C-Terminus der großen Untereinheit (nach Thornberry et al. 1997)

Eine andere Unterteilungsmöglichkeit besteht aufgrund der unterschiedlichen aminoterminalen Prodomäne:<sup>(27)</sup>

- Lange Prodomäne: Caspase -1, -2, -4, -5, -8, -9 und -10
- Kurze Prodomäne: Caspase -3, -6, -7 und -11.

In der langen Prodomäne konnten zwei wichtige Einheiten zur Interaktion zwischen verschiedenen Molekülen identifiziert werden:

Die death effector domain (DED), die in ced-3, Caspase-8 und -10 vorhanden und für den rezeptorvermittelten Zelltod über FADD/MORT 1 wesentlich ist<sup>(28)</sup>

und die Caspase recruitment domain (CARD) in ced-4, Caspase-1, -2, -4 und -9 und Apaf-1 für die Interaktion mit RAIDD/CRADD (siehe Kapitel 1.5.1).<sup>(29)</sup>

Eine weitere Unterteilung erfolgt aufgrund ihrer Substrate in drei Untergruppen:<sup>(30)</sup>

- die ICE-ähnliche Gruppe aus Caspase-1, -4, -5, -13, -11 und -12,
- die ced-3-Gruppe aus Caspase-3, -6, -7, -8, -9 und -10, und
- die dritte Gruppe nur aus Caspase-2 bestehend.

Caspasen führen nach Aktivierung zur systematischen Degradation multipler zellulärer Proteine und sind somit verantwortlich für die Ausprägung der apoptotischen Morphologie (eine Übersicht über die Substrate ergibt sich in Tabelle 3).

Mehr als 60 Proteine werden von Caspasen gespalten.

Tabelle 3: **Caspasen-Substrate** <sup>(28)</sup>

Zytoskelett- & Strukturproteine		Proteinkinasen in der Signaltransduktion	
Fodrin	Kortikales Zytoskelett	Proteinkinase C $\delta$	Signaltransduktion
$\beta$ -Catenin	Zelladhäsion	Proteinkinase C $\theta$	Signaltransduktion
Plakoglobin	Zelladhäsion	MEKK1	MAP-Kinase-Weg
Aktin	Zytoskelett	PITSLRE-Kinasen	Zellzyklus
Gelsolin	Aktin-bindendes Protein	Focal-adhesions kinase	Zelladhäsion
Keratin-18, -19	Intermediär-Filament	Calmodulin-Kinase IV	Signaltransduktion
Gas2	Organisation der Mikrofilamente	MST/Ksr	STE20-verwandte Kinase
Lamine	Kernhülle	p21-aktivierte Kinase	MAP-Kinase-Weg
Zellzyklus & Replikation		Andere Signalvermittler	
Topoisomerase-I	DNA-Replikation	Proteinphosphatase 2A	Signaltransduktion
MCM3 nukleärer Replikationsfaktor	DNA-Replikation	D4-GDP dissociation inhibitor (D4-GDI)	Inhibitor von kleinen GTPasen, Rho-Weg
DNA-Replikationskomplex C	DNA-Replikation	Ras GAP	Ras-GTPase-aktivierendes Protein
MDM2/HDM2	p53-Inhibitor	Zytosolisches PLA2	PL-Metabolismus
NuMA	Nuclear mitosis apparatus protein	p28 Bap 31	Bcl-2 Adaptor des ER
Retinoblastoma-Protein	Aufbau des Repressorkomplexes	Bcl-2	Apoptose-Inhibitor
p21	Cdk2-Inhibitor	Bcl-x <sub>L</sub>	Apoptose-Inhibitor
p27	Cdk2-Inhibitor	Bid	Apoptose-Aktivator
Wee1	Cdk2-Inhibitor, Kinase	Procaspasen	Apoptose-Kaskade
Cdc27	Zellzyklus		
Cyclin A	Mitose		
Transkription & Translation		Weitere Substrate	
SREBT (sterol-regulatory element-binding protein)	Cholesterin-Metabolismus	Huntingtin	beteiligt an Chorea
STAT1	Signaltransduktion von Zytokinen	Atrophin-1	beteiligt an der Neurodegeneration
NF- $\kappa$ B (p50, p65)	Zytokine und anti-Apoptosegene	Ataxin-3	beteiligt an der Neurodegeneration
I $\kappa$ B- $\alpha$	Inhibitor von NF- $\kappa$ B	hsp90	Hitzeschockprotein
Sp1	Transkriptionsfaktor	Rapaptin-5	Endosomenfusion
U1-70 kD sRNP	Spleißen von prä-mRNA	Preseniline	beteiligt am Morbus Alzheimer
hnRNP C1/2 (heteronuklear, ribonuklear Proteins)	Spleißen von prä-mRNA	Calpastatin	Calpaininhibitor
		Nedd4	Ubiquitin-Proteinligase
Spaltung & Reparatur von DNA		Zytokinorstufen	
<b>Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)</b>	DNA-Reparatur	Pro-Interleukin-1 $\beta$	Immunregulation
DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK)	DNA-Reparatur	Pro-Interleukin-16	Immunregulation
ICAD, DFF (Inhibitor of activated DNase)	DNA-Spaltung	Pro-Interleukin-18	Immunregulation

- Das Ergebnis ist:
- Zellzyklusarrest
  - Hemmung des Zellreparatursystems
  - Zerfall wichtiger molekularer Strukturen
  - Verlust der Zellintegrität
  - Anregung von Makrophagen
  - Abräumung der apoptotischen Restzellen.

### **1.4.3 Die Bcl-2 Proteine**

Das Bcl-2 Protein (B-cell-lymphoma/leucemia-2) ist ein anti-apoptotisches Onkogen des Säugetiers, das dem ced-9 Gen in *C. elegans* entspricht. Bcl-2 und verwandte zytoplasmatische Proteine sind essentiell für den Erhalt größerer Organsysteme. Ihre Überaktivität begünstigt malignes Wachstum. Viele Tumorzellen sind durch eine Überexpression der Bcl-2 Proteine in der Lage, sich der Apoptose zu entziehen, insbesondere Zellen lympho- und hämatopoetischer Abstammung.<sup>(31)</sup> In B-Zell-Lymphomen erfolgt eine Aktivierung durch eine Translokation der Chromosomen 14 und 18.<sup>(32)</sup> Die Bcl-2 Familie besteht aus mindestens 15 Proteinen in Säugetierzellen und Viren.<sup>(33)</sup> Alle Mitglieder besitzen mindestens eine der vier bekannten Bcl-2 homologen Domänen (BH1-BH4) und eine Transmembranregion (TM).<sup>(34)</sup>

Die weitere Analyse Bcl-2-verwandter Moleküle zeigt, dass einige der Familienmitglieder einen proapoptotischen Effekt haben.<sup>(35)</sup>

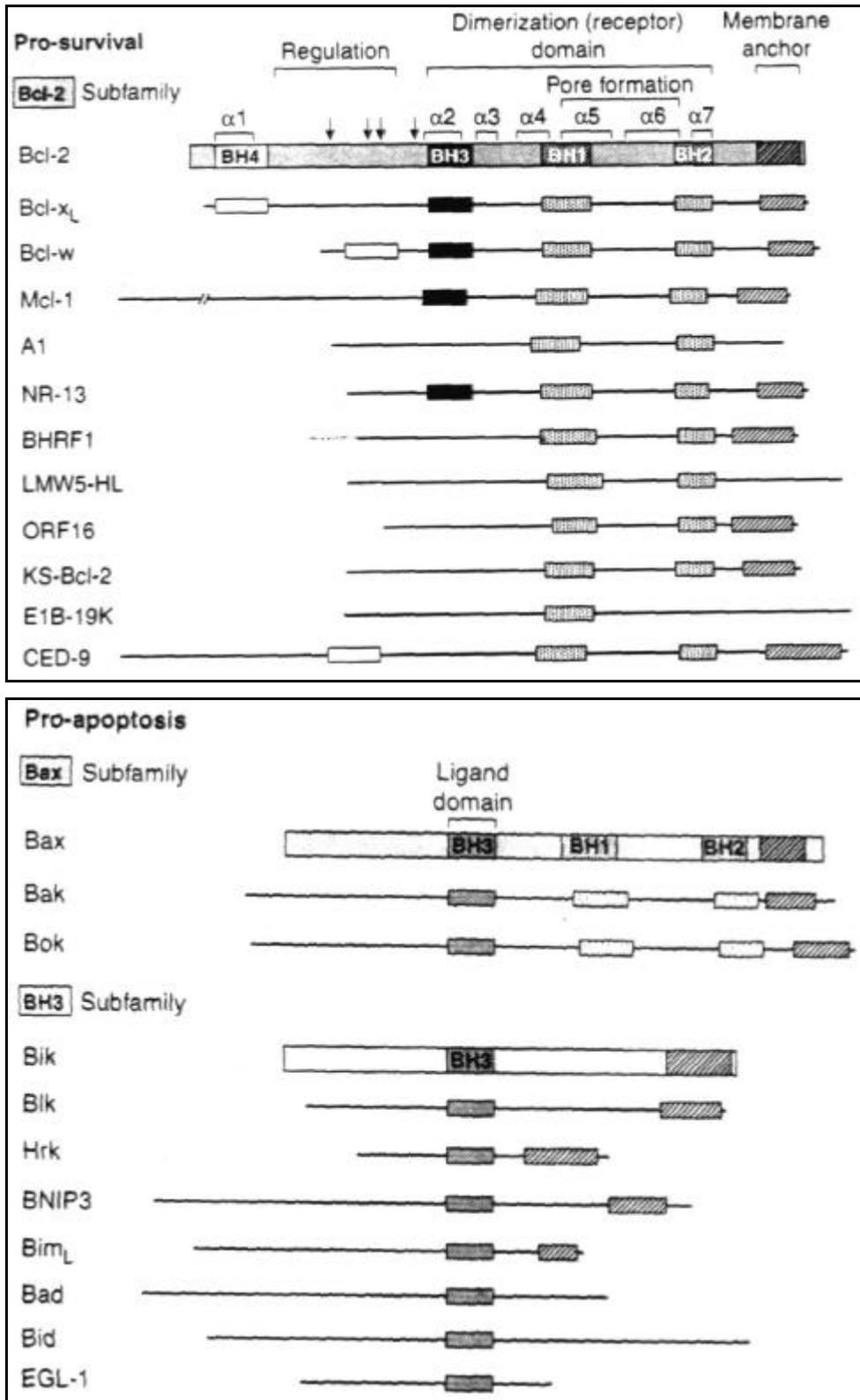


Abbildung 5: **Struktur der Bcl-2 Proteine**

Jedes Mitglied enthält eine Transmembranregion TM und vier Bcl-2-homologe Regionen BH1 bis BH4 (nach Adams et al., 1998)

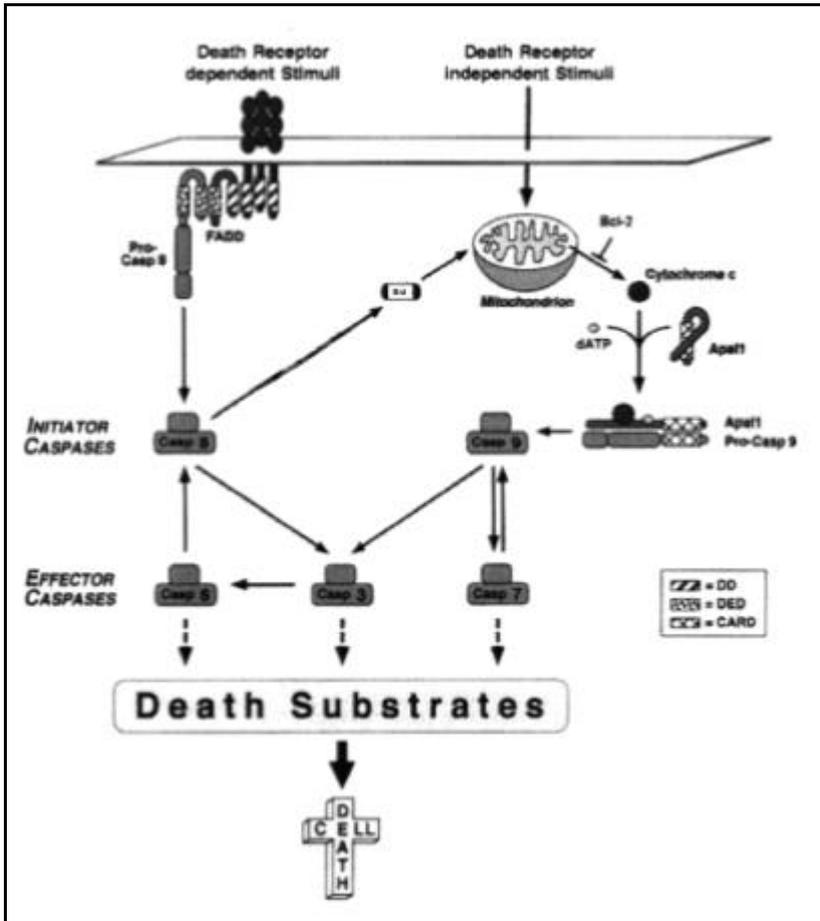
## **1.5 Die zwei Wege der Apoptose**

### **1.5.1 Die Zellstress-vermittelte Apoptose**

Hierbei erfolgt der Zelltod als Reaktion auf Bestrahlung, Zellgifte, Hitze, Kälte, virale oder bakterielle Infektionen, Entzug lebenswichtiger Faktoren und andere Stressinduktoren, die zu DNA-Schäden führen. Im idealisierten Modell erfolgt eine Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53,<sup>(36)</sup> das die Transkription des proapoptotischen Bax-Moleküls aus der Bcl-2 Familie initiiert.<sup>(37)</sup> Das Bax-Molekül kann seinerseits die Öffnung der sogenannten mitochondrialen PT-Pore (Transition Pore) bewirken,<sup>(38)</sup> bestehend aus dem Transporterprotein ANT (adenine nucleotide translocator) und dem inhibitorischen Cyclophilin D an der inneren Mitochondrienmembran und dem Kanalprotein VDAC (voltage-dependent anion channel) an der äußeren mitochondrialen Membran.

Nach direkter Bindung von Bax an ANT<sup>(39)</sup> oder VDAC<sup>(40)</sup> öffnet sich die PT-Pore. Es kommt zum Einstrom von Wasser und Elektrolyten in die Matrix des Mitochondriums und durch die entstehende Hypopolarisation bricht das mitochondriale Potential  $\Delta\Psi_m$  zusammen.<sup>(41)</sup> Es erfolgt eine Freisetzung von AIF (apoptosis inducing factor), Caspasen und Cytochrom-c, wobei die Freisetzung von Cytochrom-c der entscheidende Schritt der sogenannten mitochondrialen Apoptose ist.<sup>(42),(43)</sup>

Cytochrom-c bewirkt die Aktivierung der Caspasenkaskade über die Bindung an Apaf-1<sup>(44)</sup> zusammen mit dATP (=mitochondriales Apoptosom).<sup>(45)</sup> Die CARD-Region von Apaf-1 wird dadurch freigelegt und der dATP-Apaf-1 Komplex lagert sich an die CARD-Region der Procaspase-9.<sup>(46)</sup> Die aktivierte Caspase-9 spaltet Procaspase-3 und -7 und die Caspasenkaskade führt schließlich zum Zelltod via Apoptose.<sup>(47)</sup> Eine Blockade der Caspasen führt nach mitochondrialem Schaden zur Nekrose.<sup>(48)</sup>

Abbildung 6: **Der mitochondriale Apoptoseweg**

Zellulärer Stress setzt Cytochrom-c aus dem Mitochondrium frei. Durch Bindung von Cytochrom-c an Apaf-1 zusammen mit dATP wird die Interaktionsdomäne CARD von Apaf-1 freigegeben und Procaspase-9 kann aktiviert werden. Bcl-2 kann nur diesen Apoptoseweg hemmen über die Inhibierung der Cytochrom-c-Freisetzung (nach Los et al., 1999)

Die Schritte der mitochondrialen Apoptose sind Ansatzpunkte für die Apoptoseblockade durch Bcl-2 und verwandte Moleküle.

Hierbei verhindert Bcl-2 die Freisetzung von Cytochrom-c durch direkte Interferenz mit zum Beispiel dem proapoptotischen Bax oder durch indirekte Schritte wie zum Beispiel die Blockade der Wirkung von Bax an der PT-Pore.

### 1.5.2 Die Zelltodrezeptor-vermittelte Apoptose

Neben der stressvermittelten Apoptose existiert ein zweites System der Zelltodinduktion über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren.

Bei den Zelltodrezeptoren (TNF-R1, DR3, DR6, CD95-R, TRAIL-R1/R2) handelt es sich um Mitglieder der TNF (tumor necrosis factor)-Rezeptoren. Diese gehören zu den Typ1-Membranproteinen mit zwei bis sechs extrazellulären, cysteinreichen Domänen.

Auf der intrazellulären Seite besitzen die Zelltodrezeptoren eine sogenannte Todesdomäne (DD = death domain) aus etwa 80 Aminosäuren, die nach extrazellulärer Bindung des spezifischen Liganden (Fas-L, TNF- $\alpha$ ) an den Rezeptor mit ihrem intrazellulären Adapterprotein die Caspasenkaskade in Gang setzen.<sup>(49)</sup>

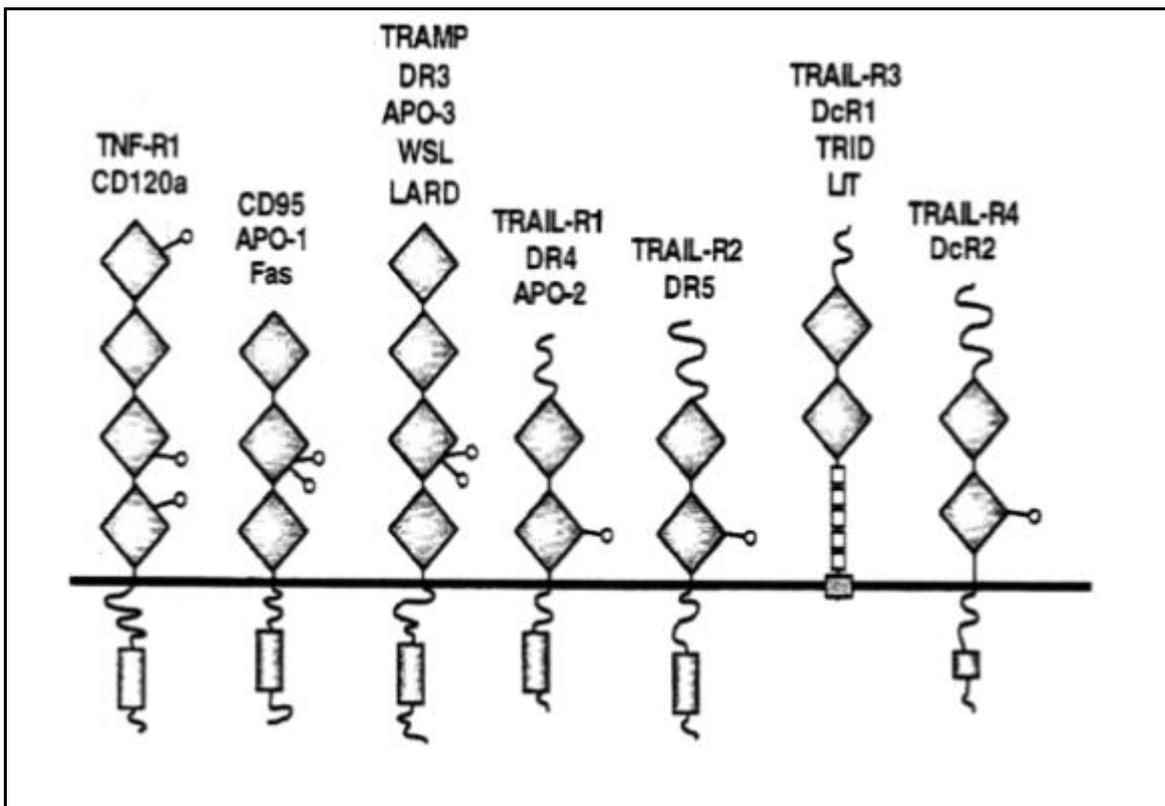


Abbildung 7: **Struktur der Todesrezeptoren**

Alle Mitglieder besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne und extrazelluläre cysteinreiche Domänen. Nur die Decoy-Rezeptoren DcR-1 und DcR-2 besitzen keine (funktionsfähige) intrazelluläre Todesdomäne (nach Schulze-Osthoff et al., 1998)

### **1.5.2.1 Der CD95 (APO-1/Fas) Rezeptor**

Der CD95 (APO-1/Fas) Rezeptor ist entscheidend für die Regulierung der Immunantwort. Eine Mutation in CD95-Genen führt bei Mäusen zu einem Lupus-erythematoses-ähnlichen Krankheitsbild mit Splenomegalie, expansiver Bildung von Anti-DNA-Antikörpern und Rheumafaktoren, Glomerulonephritis, Arthritis und Lymphadenopathie.<sup>(50)</sup> Diesem Phänotyp entspricht beim Menschen das autoimmune lymphoproliferative Syndrom oder Canale-Smith-Syndrom.<sup>(51)</sup>

Der CD95-Rezeptor vermittelt den Aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD). Das bedeutet, dass die T-Lymphozyten nach Aktivierung durch ein Antigen den Fas-Rezeptor hochregulieren und nach Bindung seines Liganden FasL (CD95L/APO-1-L) apoptotisch werden.<sup>(52)</sup>

Nach Bindung des FasL trimerisiert der Rezeptor und bindet mit seiner DD die DD seines intrazellulären Adaptermoleküls FADD (fas-associating protein with death domain = MORT1).<sup>(53)</sup> Dieser Komplex (DISC = death inducing signaling complex) bindet nun über die DED (death effector domain) des FADD-Moleküls die DED der Procaspase-8, die dadurch aktiviert wird.<sup>(54)</sup>

Man kann aufgrund der folgenden Schritte nach Scaffidi et al. zwei Arten von Zellen unterscheiden:<sup>(55)</sup>

Typ 1: Starke Aktivierung der Caspase-8 nach wenigen Sekunden, welche die Procaspase-3 nach etwa 30 Minuten spaltet.<sup>(56)</sup> Caspase-3 aktiviert nun Caspase-6 und Caspase-2 oder andere Substrate wie PARP und DFF (DNA fragmentation factor)<sup>(57)</sup>

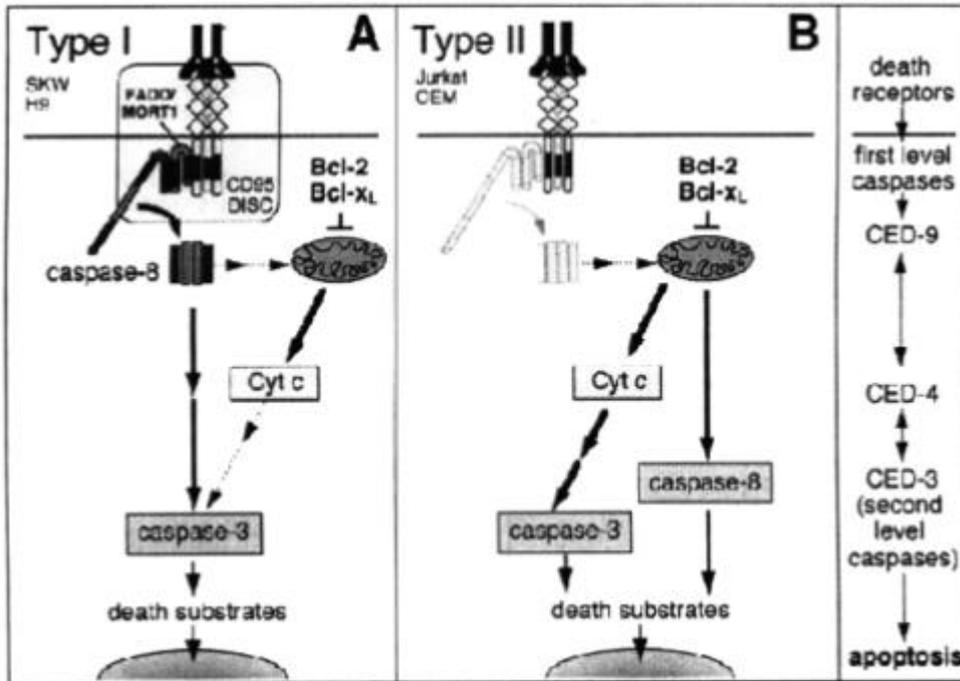
⇒ DNA-Fragmentation unter Umgehung des mitochondrialen Weges

⇒ Kein Eingriff durch Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> möglich

Typ 2: Schwache Aktivierung von Caspase-8 führt zur Spaltung von Bid,<sup>(58)</sup> Bid ist ein Protein der Bcl-2-Familie, das vom Zytosol in die Außenmembran des Mitochondriums transloziert und zur Cytochromfreisetzung nach Stimulation der Zelltodrezeptoren führt. Der mitochondriale Apoptoseweg über Caspase-9 und -3 wird initiiert.

⇒ Aktivitäten von Caspase-8 und -3 sind verschoben

⇒ Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression führen zur Blockade der Aktivierung von Caspase-8 und -3.<sup>(59)</sup>

Abbildung 8: **Modell der beiden CD95-Signalwege**

In Type-1-Zellen wird Caspase-8 stark aktiviert und die Caspasenkaskade wird unter Umgehung des Mitochondriums in Gang gesetzt.

In Type-2-Zellen wird Caspase-8 nur schwach aktiviert, über Bid führt diese zur Cytochromfreisetzung und Aktivierung der Caspasenkaskade (nach Scaffidi et al., 1998)

### **1.5.2.2 Das TRAIL-Rezeptor-System**

Neben dem CD95-System existiert mit dem TRAIL-System (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand/APO-2L) ein weiteres Zelltodrezeptorsystem, das wie FasL zur TNF-Familie gehört und Apoptose in vielen transformierten Zellen und besonders in Tumorzellen induziert.<sup>(60)</sup>

Von erheblicher Bedeutung ist die Tatsache, dass TRAIL eine deutliche Tumorzellspezifität aufweist. Im Gegensatz zu FasL wird die TRAIL-Expression in fast allen menschlichen Geweben nachgewiesen (Thymus, Milz, Lymphozyten, Intestinum, Lunge, Plazenta, Ovar und Prostata) außer Leber und Gehirn. Dies legt nahe, dass TRAIL eine physiologische Rolle übernimmt.<sup>(61),(62)</sup>

Diese Einschätzung wird durch Ergebnisse von TRAIL-knockout-Mäusen bestätigt. Sie zeigen keinen sichtbaren Phänotyp. Erst nach Injektion von syngenen Tumorzellen zeigt sich, dass die Fähigkeit, Tumorzellen abzuwerten, erheblich gestört ist.

Fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren sind identifiziert worden:<sup>(63)</sup>

TRAIL-R1 und -R2 bestehen aus einer extrazellulären TRAIL-bindenden Domäne und einer intrazellulären Todesdomäne. Sie sind eng mit dem Fas-Rezeptor verwandt.

Die Bindung von TRAIL führt nach Trimerisierung des Rezeptors über eine Bindung des Adapterproteins FADD zur Aktivierung von Caspase-8 und der weiteren Caspasenkaskade.

TRAIL-R3 und -R4 besitzen keine intakte intrazelluläre Todesdomäne. Nach TRAIL-Bindung kompetieren sie mit TRAIL-R1 und -R2 um die TRAIL-Bindung und führen somit zur Resistenz TRAIL-R3- und -R4-überexprimierender Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose.

Dadurch lassen sich Tumorzellen, denen die TRAIL-R3 und TRAIL-R4-Rezeptoren fehlen, gezielt eliminieren, während das gesunde Gewebe resistent ist.<sup>(64)</sup>

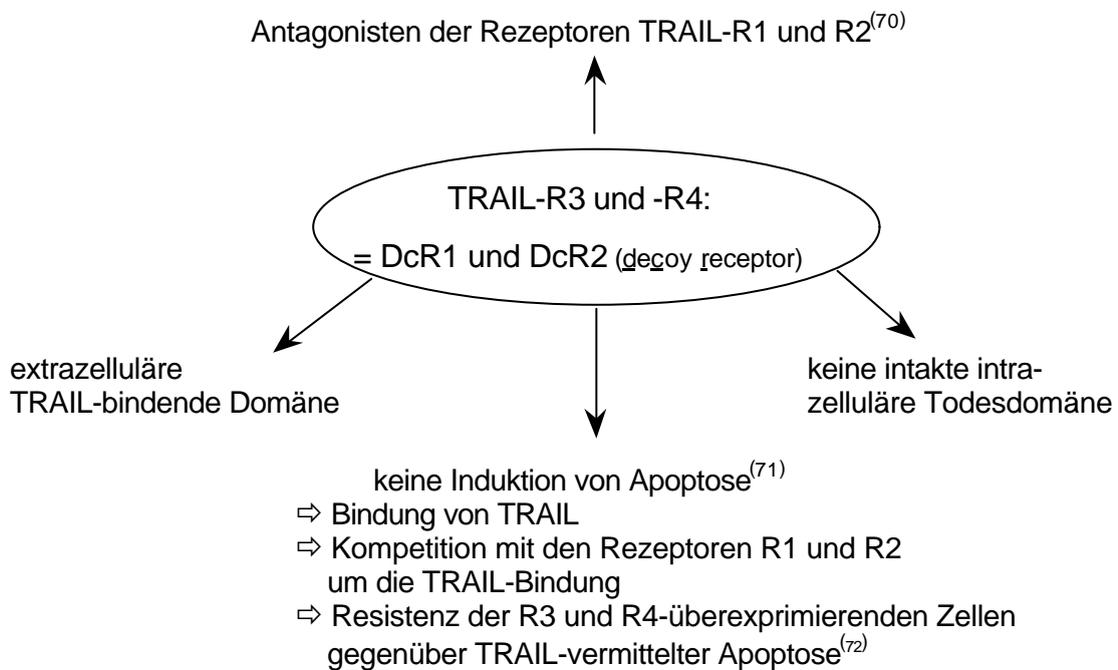
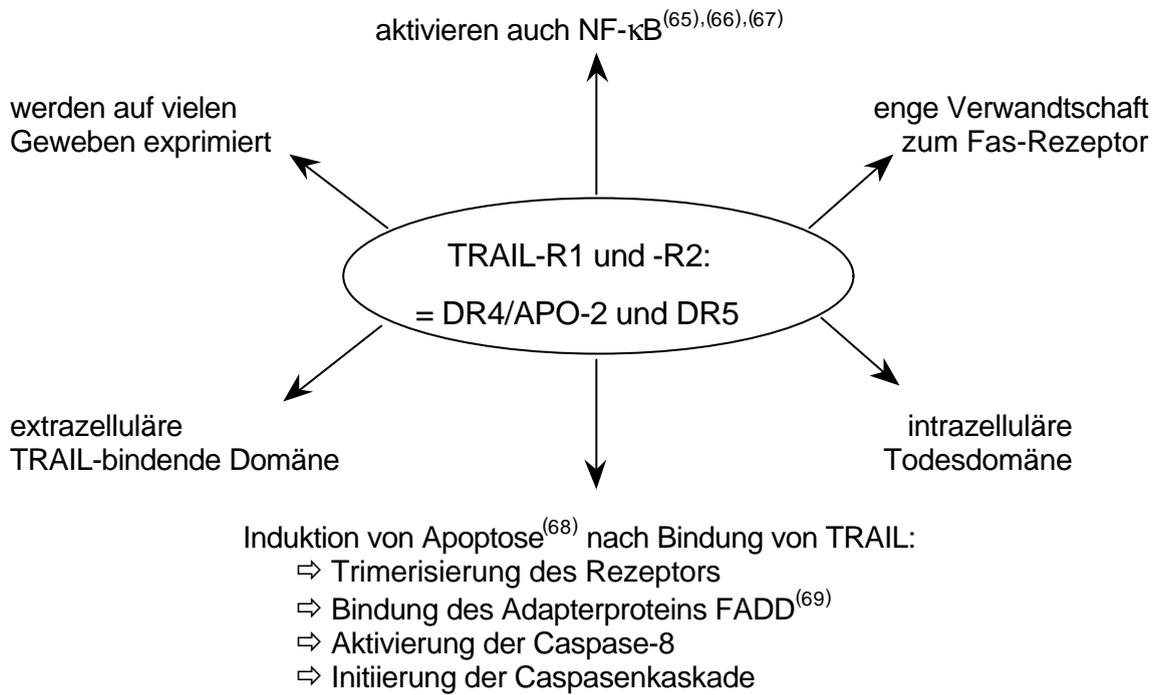


Abbildung 9: Die vier verschiedenen TRAIL-Rezeptoren

Die Rolle des fünften Rezeptors, des OPG-Rezeptors (= Osteoprotegin), ist noch nicht endgültig geklärt.<sup>73</sup>

Wie schon skizziert lassen sich zusammenfassend zwei Apoptosewege unterscheiden: Der Zelltodrezeptoren-vermittelte Weg (1) und der mitochondriale Weg (2; siehe Abbildung 10). Sie aktivieren über verschiedene Zwischenschritte die Caspasenkaskade und führen zur Apoptose der Zellen. Über Bid (Aktivierung durch Caspase-8) sind beide Wege miteinander verknüpft.

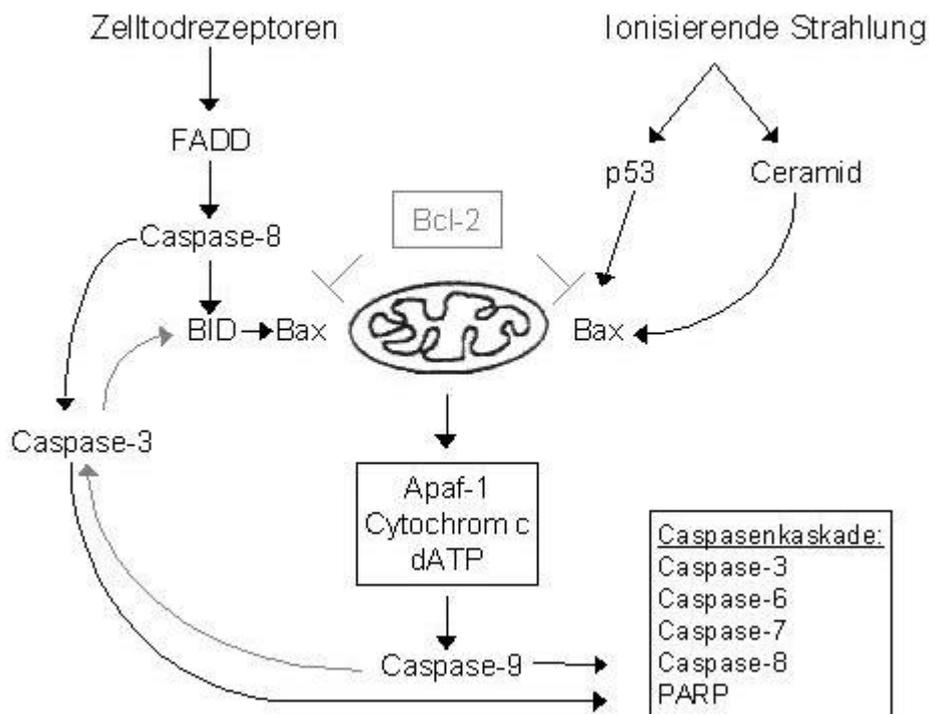


Abbildung 10: **Modell der beiden Apoptosewege** (nach Belka et al., 2002)

- (1): Aktivierung von Zelltodrezeptoren durch z. B. Fas/TRAIL.
- (2): Durch zellulären Stress (Bestrahlung) wird Cytochrom-c freigesetzt und die Caspasenkaskade über Apaf-1 nachfolgend aktiviert. Antiapoptotisches Bcl-2 hemmt den mitochondrialen Apoptoseweg durch Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium.

Im Gegensatz zu FasL führt die Injektion von TRAIL in der Maus und im Affen zu keiner Leberzelldegeneration. Menschliche gesunde Zellen wie Endothelzellen,

Lungenfibroblasten, Nieren-oder Prostatazellen zeigen keine morphologischen, apoptotischen Veränderungen nach TRAIL-Stimulation während bei Plasmozytomzellen, kolorektalen Tumorzellen, Mamma- und Bronchialkarzinomzellen, Glioblastomen und Melanomen eine Apoptoseinduktion und Verlängerung der Lebenserwartung bei Mäusen beobachtet wird.<sup>(74)</sup>

## **1.6 Themenstellung**

Da Apoptose über zwei verschiedene sich aber teilweise überlappende Wege in Gang gesetzt werden kann (siehe Abbildung 10), erscheint die Kombination von Bestrahlung und TRAIL-Behandlung besonders vielversprechend zu sein.

Durch Bestrahlung wird der mitochondriale apoptotische Signaltransduktionsweg induziert, die Aktivierung von Caspase-8 erfolgt hierbei nur zur Verstärkung über einen positiven Rückkopplungsmechanismus.

Beim zweiten, Zelltodrezeptor-vermittelten Weg erfolgt vor allem eine Aktivierung von Caspase-8, wohingegen mitochondriale Wege nur der Verstärkung dienen.

Durch Stimulation beider Wege könnten additive bis supraadditive Apoptoseeffekte erzielt werden.

Die Behandlung von Lymphomen erfolgt heutzutage abhängig vom Stadium mit Bestrahlung oder Polychemotherapie, die mit zum Teil deutlichen Nebenwirkungen behaftet sind. TRAIL hingegen hat bisher keinerlei Nebenwirkungen im Tiermodell gezeigt. Eine Kombination von TRAIL und Bestrahlung könnte somit entscheidend zu einer verbesserten Apoptoserate in Tumorzellen im Rahmen radioonkologischer Therapieverfahren beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von Bestrahlung, einer Behandlung mit TRAIL oder einer Kombination beider Stimuli bei Lymphomzellen in vitro untersucht werden. Es werden sechs verschiedene T- bzw. B-Zell-Linien untersucht. Der Nachweis der Apoptose erfolgt sowohl biochemisch als auch morphologisch.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

Humane Lymphom-Zelllinien von DSMZ Braunschweig:

- |            |   |
|------------|---|
| 207        | Humane prä-B-Zell-Leukämie-Zellen aus dem Knochenmark eines Zehnjährigen mit ALL. Es handelt sich um runde oder polygonale Suspensionszellen, die Bcl-2- und Bcl-3-mRNA exprimieren.                                    |
| C698       | Humane prä-B-Zell-Leukämiezellen aus dem Knochenmark eines Zwölfjährigen mit cALL. Es handelt sich um runde Suspensionszellen, die Bcl-2-, Bcl-3- und c-myc-mRNA exprimieren.   |
| CMLT-1     | Humane T-Zell-Leukämiezellen aus dem peripheren Blut eines 36-jährigen mit CML. Es handelt sich um runde Suspensionszellen mit bcr/abl-Translokation.   |
| DOHH-2     | Humane B-Zell-Lymphomzellen aus dem Pleuraexsudat eines Sechzigjährigen mit einem immunoblastischen B-Zell-Lymphom. Es handelt sich um einzeln oder in Gruppen wachsende Suspensionszellen, die Bcl-2-mRNA exprimieren. |
| KARPAS-299 | Humane T-Zell-Lymphomzellen aus dem peripheren Blut eines 25-jährigen mit einem T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom. Es handelt sich um runde oder polygonale, einzeln oder in Gruppen wachsende Suspensionszellen.              |
| U937       | Humane histiozytäre Lymphomzellen aus dem Pleuraexsudat eines 37-jährigen mit histiozytärem Lymphom. Die runden oder polygonalen Suspensionszellen exprimieren mRNA für c-myc.  |

## **2.2 Geräte**

Bestrahlungsgerät	LINAC SL 25, Phillips
Brutschrank	Hereus Instruments
Mikroskop	Wilovert, Wild Leitz
Sterilbank	Hereus Instruments
Tischzentrifuge	Eppendorf
Zentrifuge	Hettich
Elektrophoresekammer	Biometra
Filmentwickler	Sterling, Diagnostic Imaging
Photometer	Ultrospec Plus, Pharmacia Biosystems
Schüttler	Biometra
Tankblot	BioRad
FACS	Becton Dickinson

## **2.3 Verbrauchsmaterial**

Filterpapier	Whatman 3MM
Nitrocellulosemembran	Hybond ECL, Amersham
Kopierfolie	Xerox
Röntgenfilm	Hyperfilm, Amersham

## 2.4 Chemikalien

Acrylamid	Roth
Aprotein-Leupeptin	Sigma
APS	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
CCCP	Sigma
Deoxycholat	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
FCS	Gibco
Glycerin	Sigma
Glycin	Serva
HEPES	Sigma
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck
Kulturmedium RPMI	Gibco
Lymphoprep	Nycomed
Methanol	Merck
NaCl	Merck
NaF	Merck
$\text{NaHPO}_4$	Merck
Napp-Sodiumpyrophosphat	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Ponceau-S	Sigma
Proteinassay nach Bradford	BioRad
Rainbowmarker	Amersham
SDS	Sigma
SDS-Puffer 10-fach	Roth
TEMED	Roth

---

TMRE	Mobitech
Tris	Merck
Trisbase	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton	Sigma
Tropix	Biosystems
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Sigma

## 2.5 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	15,7 g Tris-HCl 5,84 g NaCl ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 9,5
Lysepuffer	25 mMol HEPES 0,1 % SDS 0,5 % Desoxycholat 1,0 % Triton 10 mMol EDTA 10 mMol Napp-Sodiumpyrophosphat 10 mMol NaF 125 mMol NaCl Zugabe von 20 µl/ml Aprotinin-Leupeptin vor Gebrauch
Probenpuffer	2,0 ml Glycerin 2,0 ml 10 % SDS 0,025 g Bromphenolblau 2,5 ml Sammelpuffer ad 9,5 ml dest. H <sub>2</sub> O

Sammelpuffer	6,06 g Trisbase 4 ml 10 % SDS ad 100 ml dest. H <sub>2</sub> O pH 6,8
Transferpuffer	2,9 g Glycerin 5,8 g Trisbase 0,37 g SDS 200 ml Methanol ad 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O pH 8,3
Trennpuffer	18,17 g Trisbase 4 ml 10 % SDS ad 100 ml dest. H <sub>2</sub> O pH 8,8
TBS	1,57 g Tris-HCl 8,766 g NaCl ad 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O pH 8,0
TBS-Triton	TBS + 0,02 % Triton
TBS-Tween	TBS + 0,05 % Tween 20
Blotto/Blocklösung	TBS + 0,05 % Tween 20 + 5 % FCS
PBS	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g NaHPO <sub>4</sub> 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O pH 7,4

## 2.6 Antikörper und Liganden

- Primärantikörper für Westernblot:

anti-Caspase-8, Maus	freundlicherweise erhalten von K. Schulze-Osthoff
anti-Caspase-3, Maus	Transductionlabs
anti-PARP, Kaninchen	Boehringer
anti-FADD, Ratte	Transductionlabs

- Sekundärantikörper für Westernblot:

anti-Maus IgG-AP	SantaCruz Biotechnology
anti-Kaninchen IgG-AP	SantaCruz Biotechnology
anti-Ratte IgG-AP	SantaCruz Biotechnology

- Liganden:

TRAIL (rekomb. Human mit FLAG-TAG)	Alexis
Enhancer (monokl. Ak gg. FLAG-TAG)	Alexis
anti-TRAIL-R1/R2, Maus	Immunex Corporation
FITC-markierter anti-Maus IgG-Ak	Dianova

## **3. Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Die Experimente wurden mit den Lymphomzelllinien 207, U937, CMLT-1, DOHH-2, KARPAS-299 und C698 durchgeführt. Die Suspensionszellen werden bei 37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit in RPMI, dem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin zugesetzt wurde, gehalten.

### **3.2 Einfrieren / Auftauen der Zellen**

Zum Einfrieren werden etwa  $25 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO, aufgenommen. Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C stufenweise eingefroren.

Das Wiederauftauen erfolgt möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C. Anschließend werden die Proben zweimal mit Medium gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt.

Die ersten Versuche können nach ein bis zwei Wochen durchgeführt werden.

### **3.3 Bestrahlung**

Die Zellen wurden mit 6 MV Photonen aus einem Linearaccelerator (LINAC SL25 Phillips) mit 10 Gray bei Raumtemperatur bestrahlt.

## **3.4 Messung des Zelltodes mittels Durchflusszytometrie**

### **3.4.1 Die Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie (= FACS, engl. Fluorescence Activated Cell Scan) handelt es sich um ein Fluoreszenz-basiertes Verfahren zur Zellanalyse. Man macht sich dabei die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Einzelzellen zunutze. Die Zellen können morphologisch, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, fluoreszenzfarbstoffmarkierten, monoklonalen Antikörpern hauptsächlich gegen Zelloberflächenproteine oder Propidiumjodid zur Messung des DNA-Gehalts differenziert werden.

Mittels Überdruck gelangt die Zellsuspension über eine Stahlkapillare in die Messküvette. In der Messkammer erfolgt eine starke Beschleunigung der Zellen durch die Trägerflüssigkeit, so dass die Zellen sich voneinander lösen und einzeln nacheinander den Analysepunkt passieren.

Durch den einfallenden Laserstrahl erfolgt eine Lichtstreuung zum Großteil in die Vorwärtsrichtung (FSC: engl. Forward light Scatter) und eines kleineren Anteils im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl, genannt Seitwärtsstreulicht (SSC: engl. Side Scatter). FSC ist ein Maß für die Zellgröße und SSC ein Maß für die intrazelluläre Granularität. Apoptotische Zellen unterliegen einer DNA-Fragmentierung, die morphologisch als geschrumpfte Zellen mit segmentierten und verklumpten Kernen imponieren. Dadurch weisen behandelte Zellen andere Streulichteigenschaften FSC und SSC als die unbehandelten Zellen auf.

Eine Darstellungsmöglichkeit stellt die Punktwolke (engl. dotplot) dar: Jedes gemessene Ereignis, das meistens einer Zelle entspricht, wird als ein Punkt im Koordinatensystem mit den Koordinatenklassen FSC gegen SSC dargestellt. Beim Histogramm trägt man die Klassen gegen die Anzahl der Ereignisse pro Klasse auf.

### **3.4.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials**

TMRE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch den Laserstrahl zur Lichtemission angeregt wird. Während der Apoptose erfolgt eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$ . Bei Membranschädigung des Mitochondriums wandert TMRE in die Mitochondrien und diffundiert aus dem Zytosol, so dass es nicht mehr messbar ist. So entsteht eine Linksverschiebung der Häufigkeitskurve. Mit dem FL-2-Kanal des Durchflusszytometers erfasst man das entsprechende Signal und hat somit ein Maß für das Membranpotential des Mitochondriums, das bei apoptotischen Zellen entsprechend erniedrigt ist.

Zur Messung des  $\Delta\Psi_m$  werden jeweils  $10^5$  Zellen mit 1200 U/min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 200  $\mu$ l TMRE-Farbstoff aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgt die Messung.

### **3.4.3 TRAIL-R1/R2-Oberflächenexpression**

Zur Erfassung der TRAIL-R1/R2-Oberflächenexpression werden die Zellen mit einem gegen die TRAIL-Rezeptoren R1/R2 gerichteten Antikörper markiert, an den Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt werden, um die verschiedenen Zellen im Durchflusszytometer anhand ihrer Oberflächenexpression zu analysieren.

Von jeder Zelllinie werden vier Proben mit ca. 500.000 Zellen angesetzt. Die Proben werden fünf Minuten mit 1200 U/min bei 4°C zentrifugiert, nach dem Absaugen des Überstandes werden die Proben in 100  $\mu$ l einer Lösung bestehend aus PBS und 5 % FCS resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis erfolgt die Markierung mit den Antikörpern.

Die erste Probe dient zur Kontrolle und bleibt unmarkiert. Die zweite Probe wird nur mit der 1:500 verdünnten fluoreszenz-markierten Zweitantikörperlösung versetzt, die dritte und vierte Probe werden mit dem gegen die Trail-Rezeptoren R1 bzw. R2 gerichteten Antikörper resuspendiert, von dem zuvor eine Lösung mit der Verdünnung 1:100 angesetzt wurde.

Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten auf Eis, viermaligem Zentrifugieren, Absaugen und Resuspendieren werden die dritte und vierte Probe mit der Zweitantikörperlösung FITC versetzt. Man inkubiert die Proben für 30 Minuten auf Eis und resuspendiert sie in 500 µl FACS-Flow. Gemessen wird im Fluoreszenzkanal FL-1, da der FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Farbstoff sein Emissionsmaximum bei 525 nm hat.

### **3.5 Nachweis der Caspasenaktivität mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot**

#### **3.5.1 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Zellen werden in sechzehn Kleinquadraten pro Diagonale ausgezählt. Das Ergebnis wird durch zwei dividiert, mit 5000 multipliziert und ergibt die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

#### **3.5.2 Herstellung der Zellysate**

Der Kulturflasche werden die anhand der Zellzählung ermittelten Milliliter an Zellsuspension entnommen. Jede Probe enthält etwa  $2 \times 10^6$  Zellen, die nach 48-stündiger Behandlung mit TRAIL oder Bestrahlung für fünf Minuten bei 1200 U/min und 6°C zentrifugiert werden. Der Überstand wird abgesaugt und mit 200 µl Lysepuffer resuspendiert.

Die Proben inkubieren für 30 Minuten auf Eis und werden im Anschluss bei 1200 U/min und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert.

Nur der Überstand wird für die folgende Proteinbestimmung verwendet.

### **3.5.3 Proteinbestimmung**

Um jede Spur des Westernblots mit gleichen Proteinmengen beladen zu können, wird eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dazu wird der Proteinassay nach Bio-Rad mit Wasser 1:5 verdünnt. 3 µl Zellysat werden in einem Milliliter der verdünnten Lösung aufgenommen.

Es entsteht ein blauer Farbstoff, abhängig von der Gesamtproteinmenge des Lysats. Die Extinktion wird bei 595 nm mit dem Photometer gemessen und entspricht der Menge des gebildeten Farbstoffs, folglich der Gesamtproteinmenge.

### **3.5.4 Probenvorbereitung**

Man normalisiert die Proben auf gleiche Mengen Protein und fügt 30 µl Lysat 5µl Western-Probenpuffer hinzu. Hauptbestandteil ist das Natriumdodecylsulfat SDS (engl. Sodium dodecyl sulfate), ein negativ geladenes Detergens. Dieser Sulfat-ester des Dodekanols bindet mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Bezirke des Proteins, so dass das Molekül denaturiert, sich entfaltet und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Lipiden aufgehoben werden.

Der nach außen gerichtete, negativ geladene Sulfatrest des SDS ermöglicht die Löslichkeit in wässriger Umgebung.

Es werden 2 µl β-Mercaptoethanol zum Lysat-Puffergemisch hinzugegeben und für fünf Minuten im Wasserbad gekocht. Mercaptoethanol ist ein reduzierender Stoff, der Disulfidbrücken spaltet, so dass über Disulfidbindungen gekoppelte Proteinkomplexe in ihre Einzelbestandteile zerfallen.

### **3.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Grundprinzip aller elektrophoretischen Methoden ist die Wanderung geladener Teilchen zu einer Elektrode umgekehrter Polarität. Mit Hilfe der Gelelektrophorese

erfolgt heute meist die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen.

Die Proteine wandern im elektrischen Feld je nach Ladung, Größe und Gestalt in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein Gel. Kleine Proteine gelangen schneller durch die Poren des Gels und sind nach Abschluss der Elektrophorese der Anode am nächsten. Durch die überschüssige negative Ladung des SDS sind alle Proteine in der Lage, zur Anode zu wandern und werden nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Als Träger dient bei der SDS-PAGE ein hochvernetztes Polyacrylamidgel, das direkt vor dem Lauf durch Polymerisierung von Monomeren hergestellt wird: Zwischen Acrylamid und Bisacrylamid wird mittels eines Kettenstarts eine Polymerisationsreaktion eingeleitet. Das Endprodukt ist ein langes Molekül aus Acrylamideinheiten, das Polyacrylamid. Die Quervernetzung wird durch das Bisacrylamid gewährleistet. Die Polymerisation erfolgt zwischen zwei Glasplatten. Die Porengröße des Gels kann durch Variation der Acrylamidkonzentration so eingestellt werden, dass sich eine optimale Auftrennung der Proteine ergibt. Hergestellt werden zwei Gele: Das Sammelgel enthält eine niedrige Acrylamidkonzentration.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Westernblot-Gele

	Sammelgel	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Trenngel 14 %
Trennpuffer	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Sammelpuffer	0,88 ml	-	-	-
Wasser	2,10 ml	6,25 ml	5,25 ml	4,25 ml
Gel 30	0,03 ml	5,00 ml	6,00 ml	7,00 ml
APS (100 mg/ml H <sub>2</sub> O)	35,0 µl	75,0 µl	75,0 µl	75,0 µl
Temed	3,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
20 % SDS	-	75,0 µl	75,0 µl	75,0 µl

Mit Hilfe eines Kammes werden Taschen gebildet, in welche die vorbereiteten Proben pipettiert werden. Aufgrund der großen Porengröße wird das Gel bei 50 mA schnell passiert und die Proben sammeln sich an der Grenze zum Trenngel.

Im Trenngel erfolgt die Trennung nach Molekulargewicht bei 150 mA.

Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern durch das Polyacrylamidgel zur positiven Elektrode und die Proteine liegen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt vor.

Die Molekulargewichte werden in Dalton (D) oder kilo-Dalton (kD) angegeben.

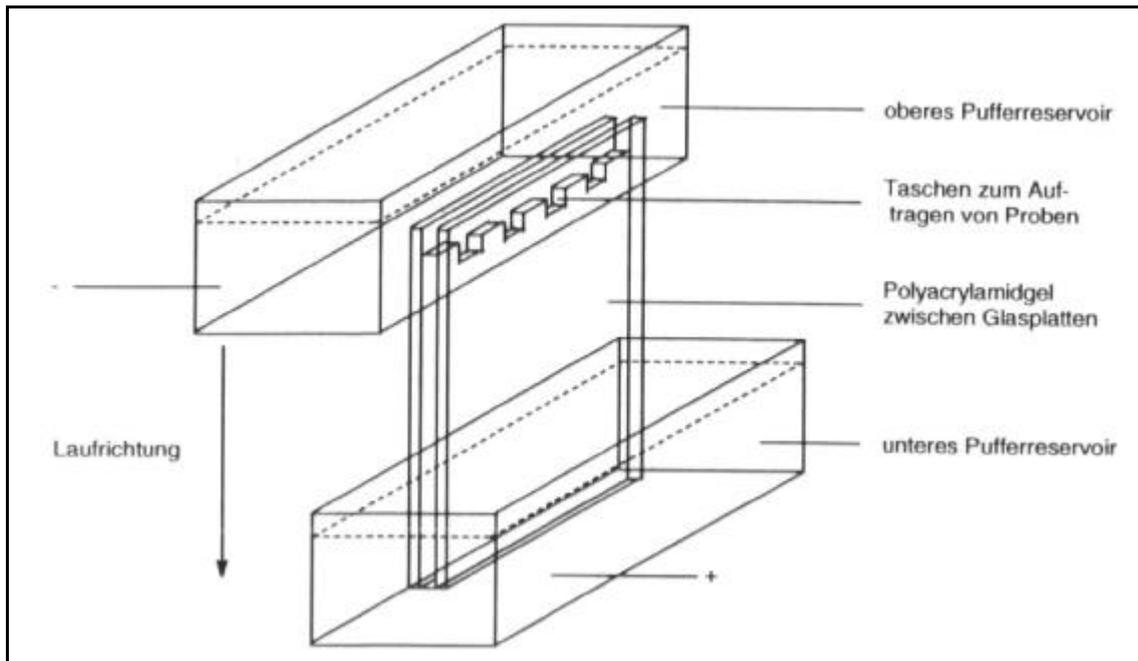


Abbildung 11: **Aufbau einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen**

### **3.5.6 Westernblot-Verfahren**

Im Westernblot erfolgt ein Abklatsch (Blot) der auf dem Gel separierten Proteine auf Nitrocellulose.

Dazu löst man nach Abschluss der Elektrophorese das Gel vorsichtig von den Glasplatten und bettet es auf ein Stück Nitrocellulosefilter. Zwischen Filterpapier und Schwammeinlagen gepackt wird die Membran mit dem Gel in eine Transferkassette eingespannt. Man setzt das Gel erneut einem elektrischen Feld senkrecht zur ersten Laufrichtung aus. Das Blotten erfolgt acht Stunden bei 0,1 A in einem

Tankblot mit Transferpuffer. Die Proteine wandern in die Nitrocellulosemembran und werden dort festgehalten.

Jetzt können die Proteine mit dem entsprechenden Antikörper versetzt werden.

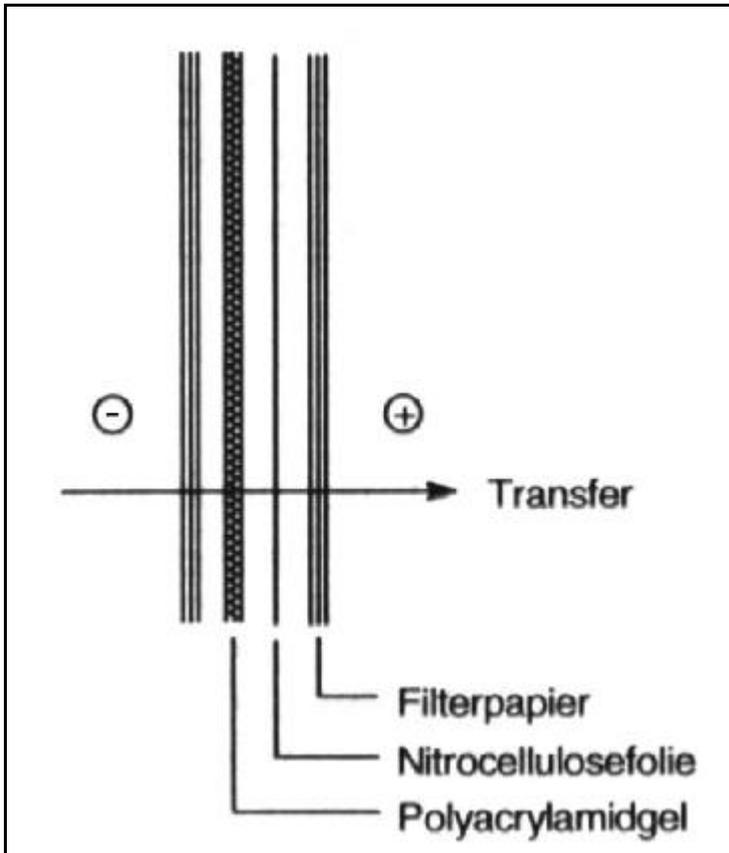


Abbildung 12: **Aufbau eines Westernblots**

Die nächsten Schritte finden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler statt. Als erstes erfolgt die Färbung mit Ponceau-S-Lösung. Diese bindet unspezifisch an die aufgetrennten Proteine auf der Membran, nach fünf Minuten wird die Lösung mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Ist die Proteinübertragung gleichmäßig erfolgt, wird die Membran für 30 Minuten mit einer Lösung aus TBS-Tween und 5 % FCS (BLOTTO) inkubiert. Dadurch werden die proteinfreien Stellen auf der Membran besetzt, bevor der erste Antikörper zugesetzt wird. Dieser bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein, nach einer Stunde wird der nicht gebundene Anti-

körper mit TBS-Triton dreimal für jeweils sieben Minuten herausgewaschen. Um den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar zu machen, wird die Membran mit dem sekundären Antikörper versetzt, dessen Antigen der erste Antikörper ist. Die Antikörperlösung, bestehend aus 40 ml Blotto und 2  $\mu$ l sekundärem Antikörper in Verhältnis 1:20000, wird für 30 Minuten mit der Membran inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist an das Enzym AP gekoppelt, das mittels Umsetzung eines Substrates eine Lichtfreisetzung bewirkt. Nach dem Entfernen des überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpers mit TBS-Triton für dreimal fünfzehn Minuten und einer zehnminütigen Äquilibration mit AP-Puffer erfolgt die Zugabe des Substrates. Nach einer Inkubation von fünf Minuten mit der Detektionslösung wird der Blot mit einem Film und zwei Klarsichtfolien für 30 Minuten bis 24 Stunden je nach Antigen in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Auf dem entwickelten Film sind die Licht-emissionen festgehalten und als Bande auf diesem sichtbar.

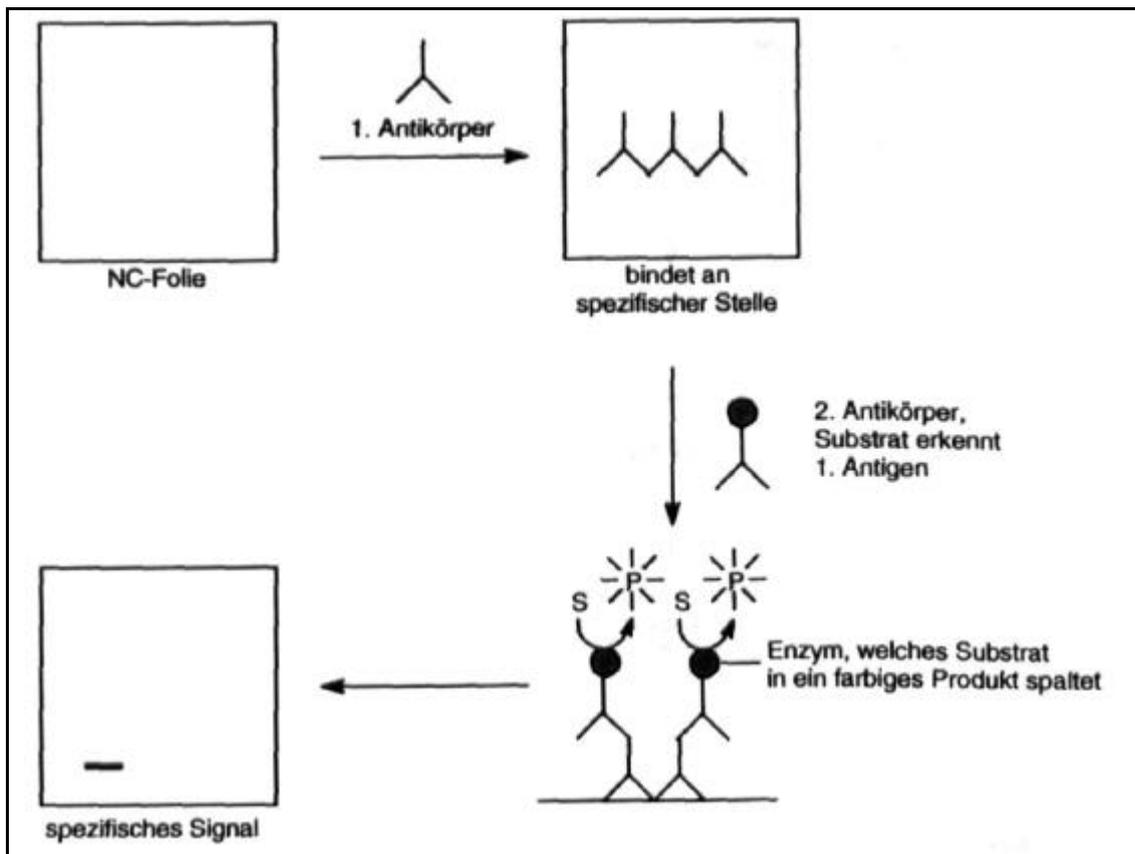


Abbildung 13: Die Nachweisreaktion im Westernblot-Verfahren

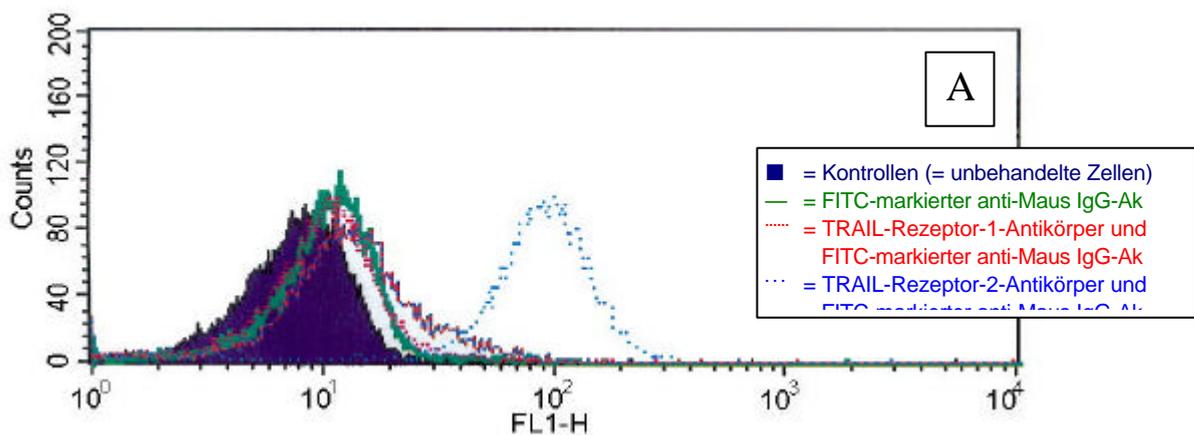
## 4. Ergebnisse

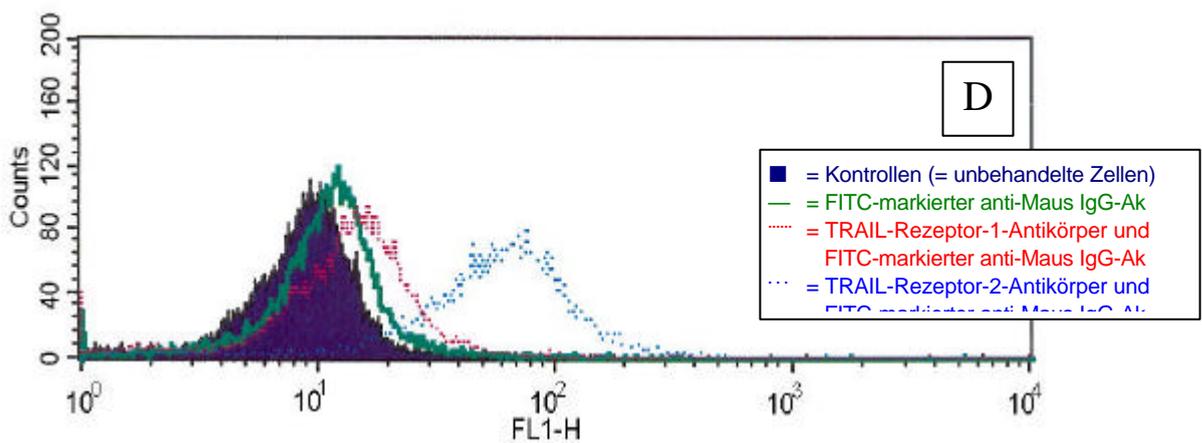
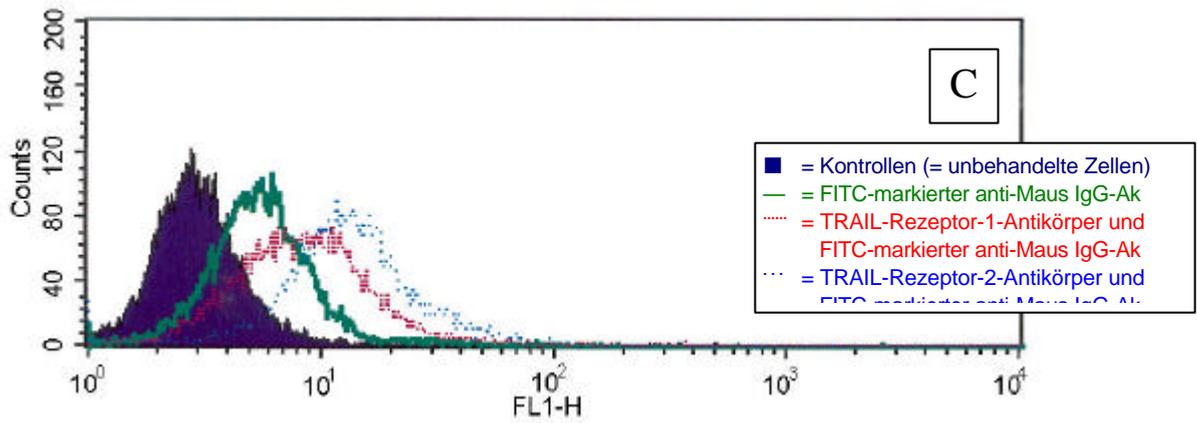
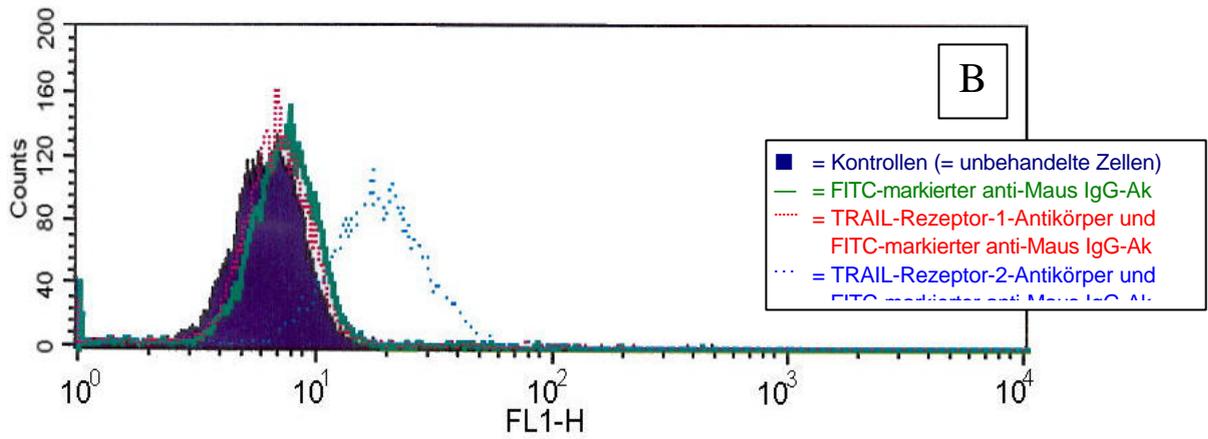
### 4.1 TRAIL-R1- und -R2-Oberflächenexpression

Zur Erfassung der TRAIL-R1- und -R2-Oberflächenexpression wurden die T- bzw. B-Zell-Lymphomzelllinien 207, C698, DOHH-2, CMLT-1, KARPAS-299 und U937 verwendet.

Als erstes haben wir untersucht, ob die TRAIL-Rezeptoren R1 und R2 auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Dazu wurden die Zellen mit einem gegen R1 bzw. R2 gerichteten Antikörper markiert und im Durchflusszytometer die Oberflächenexpression durch die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe erfasst.

Abbildung 14 zeigt die dabei ermittelten Histogramme. Zur Kontrolle wurde eine Probe gar nicht markiert, eine andere Probe wurde nur mit dem Zweitantikörper (FITC-markierter anti-Maus IgG-Ak) versetzt.





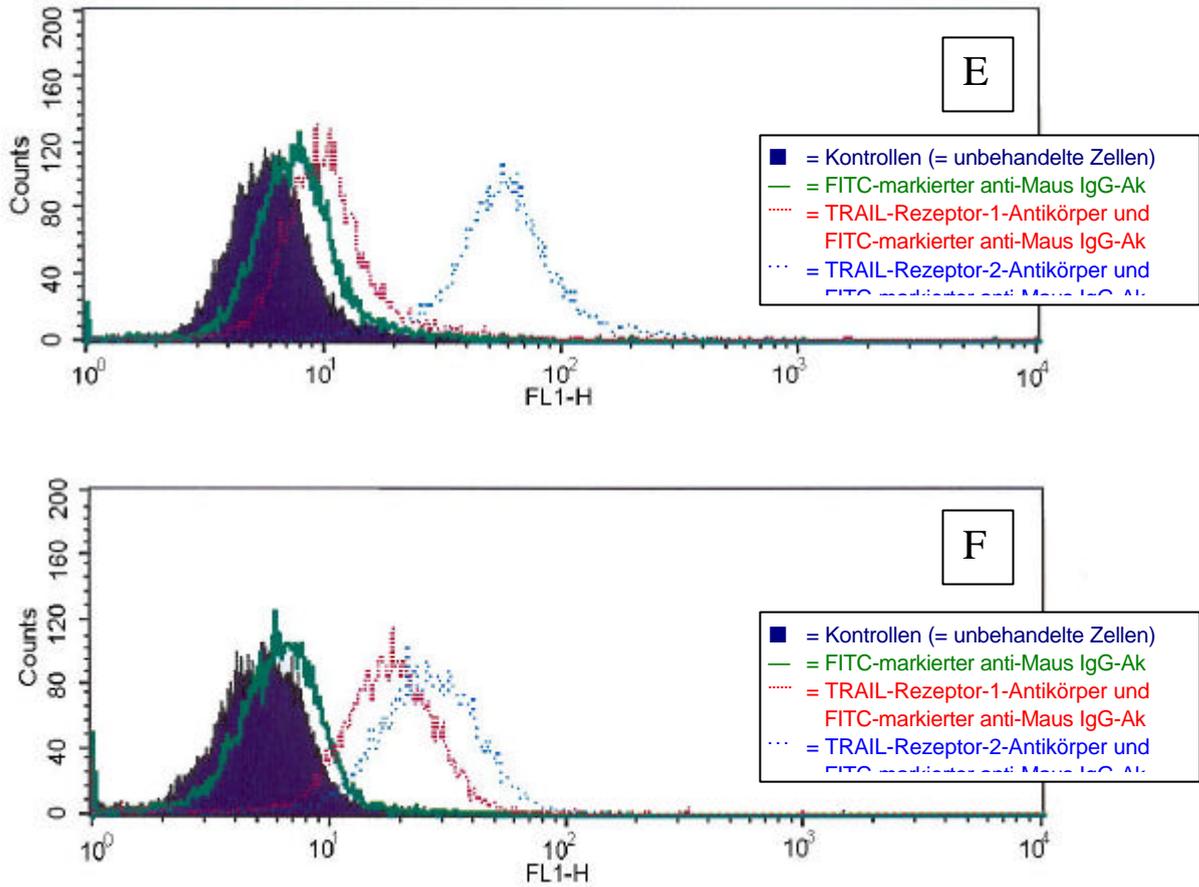


Abbildung 14: **Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptor R1 und R2.**  
 Eine Rechtsverschiebung der Kurve bedeutet eine erhöhte Rezeptor-Expression.

- A: 207
- B: U937
- C: CMLT-1
- D: DOHH-2
- E: KARPAS-299
- F: C698

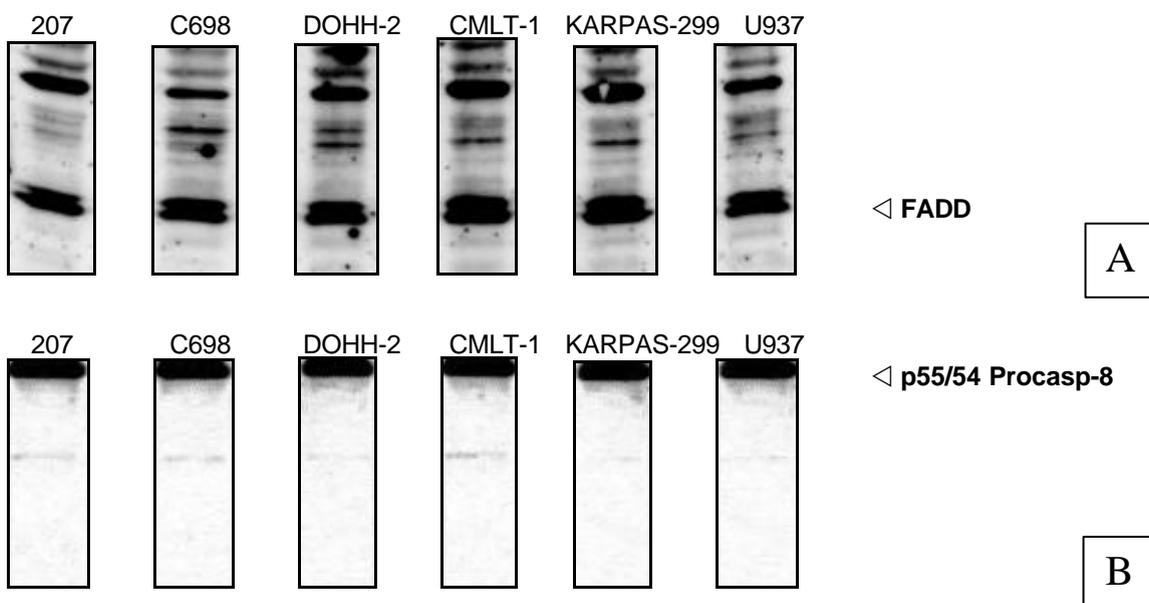
Tabelle 5: **Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptor R1 und R2.**

	Trail-R1	Trail-R2
207	-	+
U937	-	+
CMLT-1	+	+
DOHH-2	+	+
KARPAS-299	-	+
C698	+	+

Alle Zellen exprimieren den R2-TRAIL-Rezeptor, erkennbar an der Rechtsverschiebung des Signals im Vergleich zu den Kontrollen. Der R1-TRAIL-Rezeptor wird bei den Zelllinien CMLT-1 und DOHH-2 gering und bei C698 deutlich exprimiert. Somit exprimieren alle untersuchten Zelllinien mindestens einen TRAIL-Rezeptor.

## **4.2 Nachweis von FADD, Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-3** **im Westernblot**

Zelltodrezeptor-vermittelte Apoptose ist abhängig von Caspase-8. Da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass TRAIL-vermittelte Apoptose in T-Zell-Lymphomen wie Jurkat das Zelladaptermolekül FADD benötigt und Caspase-8 von wesentlicher Bedeutung ist, wurde als zweiter Schritt die Grundrate der Expression dieser Moleküle auch in den sechs Zelllinien 207, C698, DOHH-2, CMLT-1, KARPAS-299 und U937 biochemisch untersucht. Mit den unbehandelten Lymphom-Zelllinien wurden Zelllysate hergestellt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Westernblots in Abbildung 15 zeigen das charakteristische Bandenmuster von FADD und den ungespaltenen Procaspasen-8 und -3.



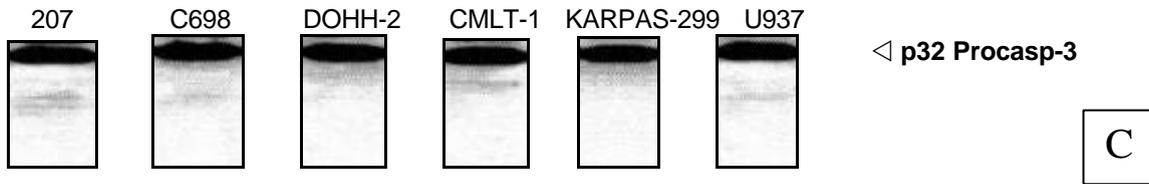


Abbildung 15: **Westernblotanalyse der Zelllinien 207, C698, DOHH-2, CMLT-1, KARPAS-299 und U937 für die Grundrate der Expression für**  
 A: FADD  
 B: Caspase-8  
 C: Caspase-3

### **4.3 Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung in Lymphomzellen**

Anschließend wurde die Wirkung von ionisierender Strahlung auf Lymphomzellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt und mittels TMRE-Färbung der Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials  $\Delta\Psi_m$  zum Nachweis der Apoptoseinduktion im Durchflusszytometer erfasst. Als Kontrolle dienten die unbestrahlten Lymphomzellen.

In Abbildung 16 sind zwei erhaltene Punktwolken (Dotplots) dargestellt. Jeder Punkt entspricht einem Fluoreszenzereignis, was in der Regel einer Zelle entspricht. Die apoptotischen Zellen wurden markiert und deren Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt. Durch die Messung der unbehandelten Kontrollen wird die Spontanapoptose ermittelt. Wird diese von der Apoptoserate der behandelten Zellen abgezogen, erhält man die spezifische Apoptose. Die Zellen wurden mit ca.  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät, um die unerwünschte Spontanapoptose so gering wie möglich zu halten.

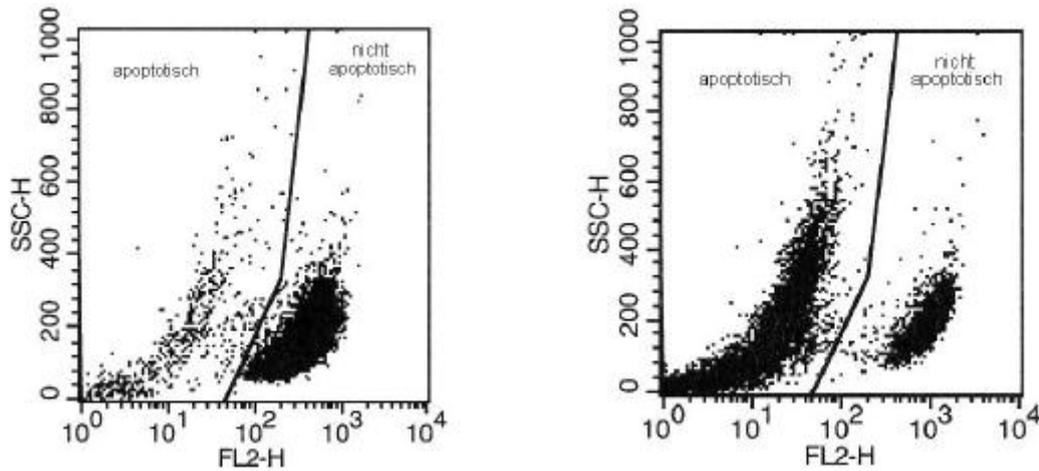


Abbildung 16: **Zwei exemplarische Dotplots**; Zelllinie 207

links: Die Kontrolle (unbehandelt) zeigt die Spontanapoptose  
rechts: 48 Stunden nach Behandlung mit 100 ng/ml TRAIL

Um zu bestätigen, dass es sich bei den FACS-Messungen tatsächlich um Apoptose handelt, wurden in Vorversuchen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mittels Kernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 überprüft. Dabei wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop apoptotische von nekrotischen Kernen differenziert und mit den Ergebnissen der FACS-Analyse verglichen. Es zeigte sich tatsächlich, dass diese beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt. Abbildung 17 zeigt die statistische Auswertung der erhaltenen Daten.

48 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gray wird eine Apoptoserate von 25 % bei U937 und 54 % bei 207 erreicht. CMLT-1 reagiert nur mit 45 % Apoptose, DOHH-2 mit 43 %, KARPAS-299 mit 16 % und C698 mit 6 %.

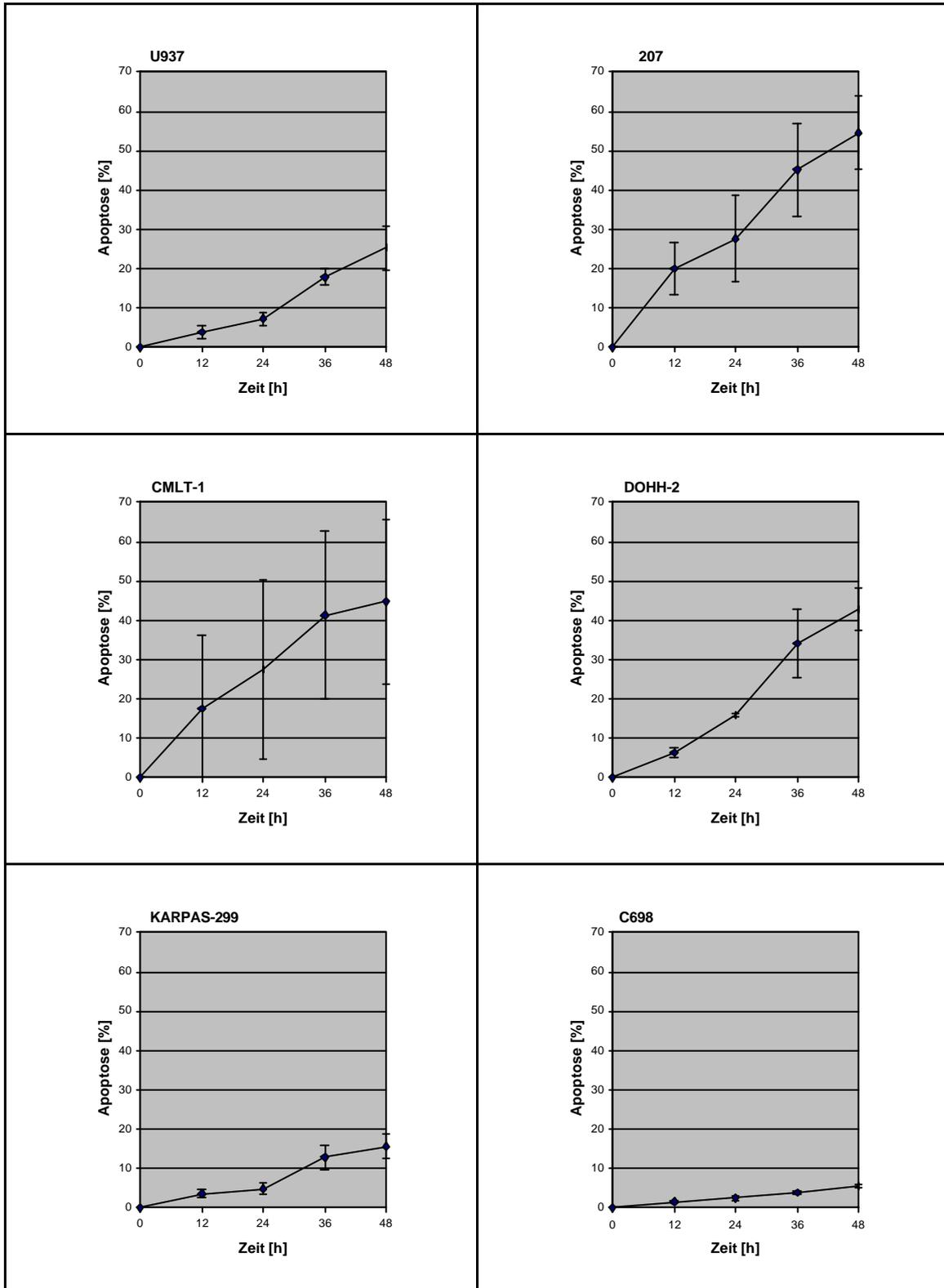


Abbildung 17: Zeitabhängige Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung mit 10 Gray in Lymphomzellen bis 48 Stunden; die Balken stellen die Standardabweichung dar (n=3).

#### **4.4 Apoptoseinduktion durch TRAIL in Lymphomzellen**

Zur Apoptoseinduktion durch TRAIL wurden die Zellen mit 100 ng/ml TRAIL stimuliert und die Apoptose mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Eine höhere TRAIL-Dosis als 100 ng/ml führt zu keiner Apoptoseverstärkung (nicht dargestellt). Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde den behandelten Zellen ein monoklonaler FLAG-TAG-Antikörper (Enhancer) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Dadurch werden die gebundenen TRAIL-Monomere zu Dimeren kreuzvernetzt und die Wirkung des TRAILs erhöht sich.

In Abbildung 18 ist die zeitabhängige Induktion von Apoptose in den verschiedenen Lymphomzelllinien dargestellt.

Stimulierung der Zellen mit 100 ng/ml TRAIL führt bei U937 zu einer Apoptoserate von 63 % und bei 207 von 59 % nach 48 Stunden. C698, DOHH-2 und KARPAS-299 zeigen keinerlei Reaktion auf die TRAIL-Behandlung, die Apoptoserate von CMLT-1 beträgt nur 2 %.

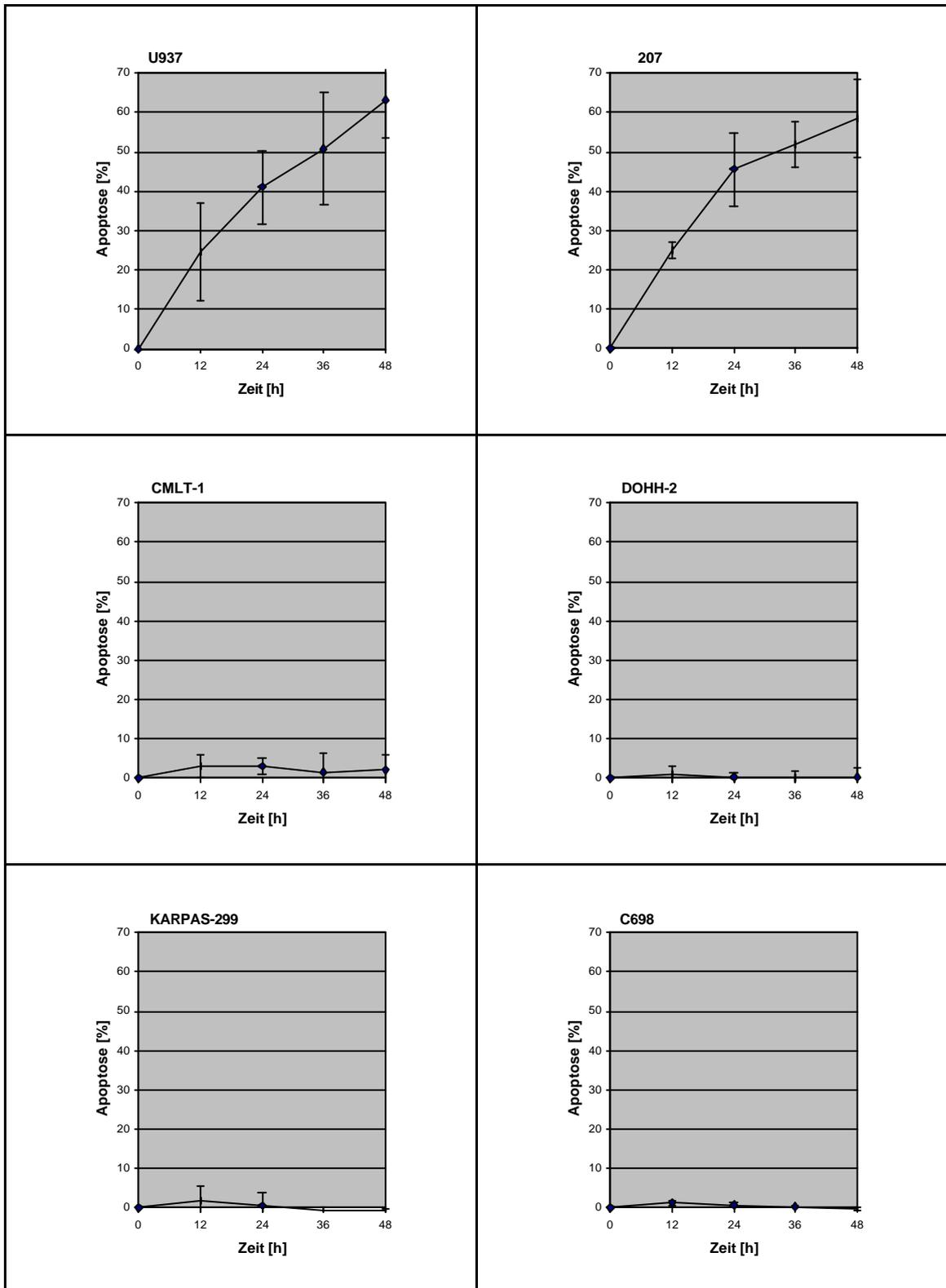


Abbildung 18: zeitabhängige TRAIL-induzierte Apoptose in Lymphomzellen bis 48 Stunden; die Balken stellen die Standardabweichung dar (n=3).

## 4.5 PARP-Aktivierung durch ionisierende Strahlung in Lymphomzellen

Mittels Westernblot bestätigte sich biochemisch die im Durchflusszytometer ermittelte, durch Bestrahlung induzierte Apoptose. PARP, ein Substrat der Effektor-Caspase-3, ein Marker der gemeinsamen Endstrecke des Zelltodrezeptor-vermittelten und bestrahlungsinduzierten Apoptoseweges ist dafür besonders gut geeignet.

207, C698, DOHH-2, CMLT-1, KARPAS-299 und U937 wurden mit 10 Gy bestrahlt, nach 12, 24 und 48 Stunden erfolgte die Herstellung der Zelllysate und anschließend die elektrophoretische Auftrennung.

Abbildung 19 zeigt die erhaltenen Westernblots. Zu erkennen sind die inaktive PARP und die durch PARP-Spaltung entstandenen aktiven PARP-Untereinheiten. Die PARP-Aktivität lässt sich entweder durch Intensitätsabnahme der inaktiven Pro-Form oder durch Zunahme der Intensität der aktiven PARP-Spaltprodukte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nachweisen.

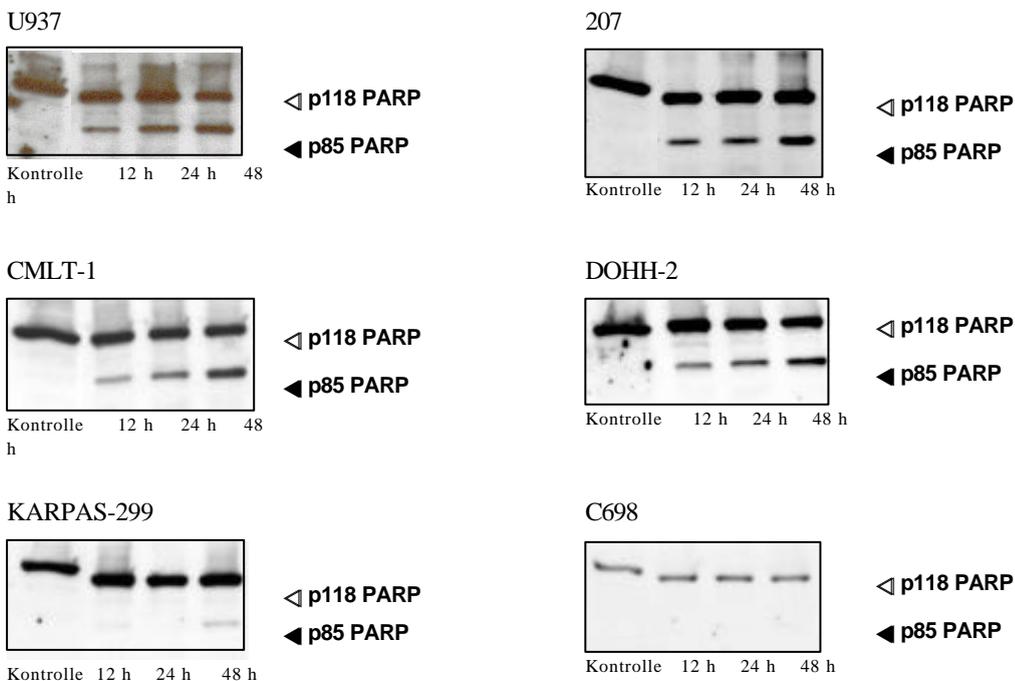


Abbildung 19: **Aktivierung von PARP durch Bestrahlung mit 10 Gy in Lymphomzellen.**  
(Kontrolle = unbehandelte Zellen)

## 4.6 PARP-Aktivierung durch TRAIL in Lymphomzellen

Auch bei der Aktivierung von PARP durch TRAIL erfolgte ein biochemischer Nachweis der im Durchflusszytometer ermittelten Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml TRAIL und 1 µg/ml Enhancer stimuliert und nach Gewinnung der Zellysate nach 12, 24 und 48 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt.

In Abbildung 20 sind die hierbei erhaltenen Westernblots dargestellt.

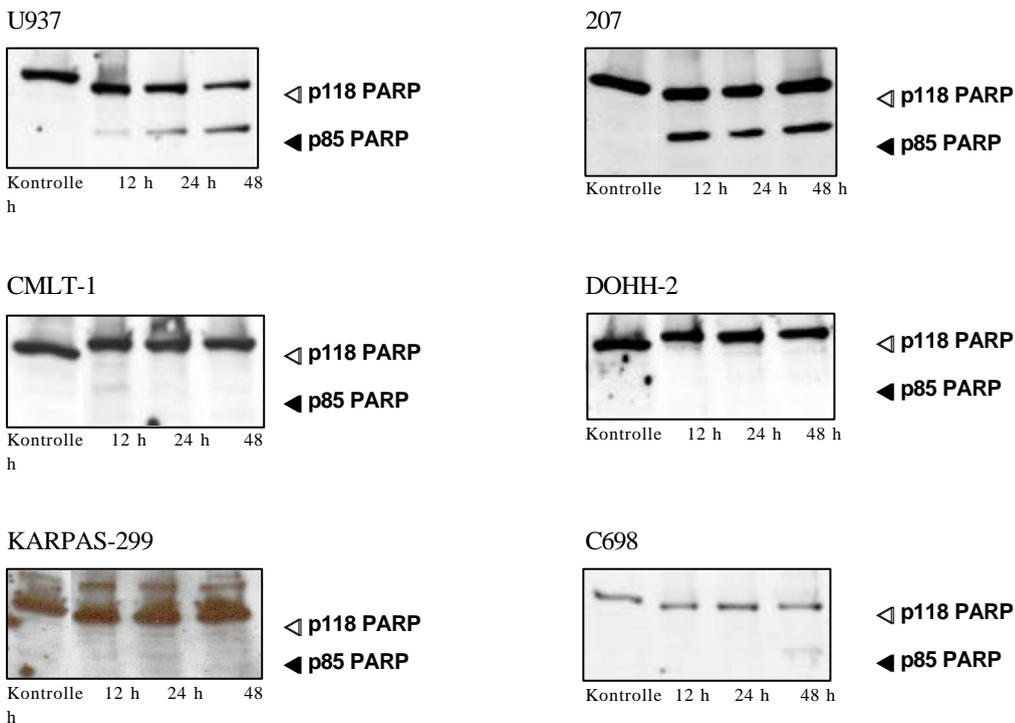


Abbildung 20: **Aktivierung von PARP durch Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL**  
(Kontrollen = unbehandelte Zellen)

U937 zeigt erst 48 Stunden nach Bestrahlung eine geringe PARP-Aktivierung, bei TRAIL-Stimulierung erkennt man eine deutliche Aktivitätszunahme bis zum Signalmaximum nach 48 Stunden.

Bei 207 erkennt man eine deutliche PARP-Aktivierung sowohl 12 Stunden nach

Bestrahlung als auch nach Behandlung mit TRAIL, wobei im zweiten Fall das Signal deutlich stärker als nach Bestrahlung ist.

CMLT-1 zeigt ein deutliches Signal 48 Stunden nach Bestrahlung, durch TRAIL wird PARP nicht aktiviert.

KARPAS-299 zeigt eine starke PARP-Aktivierung 48 Stunden nach Bestrahlung. Durch TRAIL kommt es zu keiner Aktivitätszunahme, was sich auch bei DOHH-2 beobachten lässt.

C698 zeigt selbst nach 48 Stunden bei beiden Behandlungen keinerlei PARP-Aktivierung.

#### **4.7 Kombinationswirkung von ionisierender Strahlung und TRAIL in Lymphomzellen**

Die Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren und Bestrahlung laufen über getrennte Wege, die sich teilweise überlappen. Daher stand beim weiteren Vorgehen der Untersuchung im Mittelpunkt, ob eine Kombination von Bestrahlung und TRAIL zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt. Dazu wurden die Zellen mit 10 Gy und 100 ng/ml TRAIL simultan behandelt. Auf eine sequentielle Applikation der ionisierenden Strahlung im Sinne einer Vorbestrahlung wurde verzichtet, da Vorversuche zu dieser Arbeit keinen zusätzlichen Effekt zeigten. Nach 12, 24, 36 und 48 Stunden wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt und mittels Westernblot-Technik die Aktivität von PARP als gemeinsame Endstrecke beider Apoptosewege biochemisch bestätigt. Die Zelllysate wurden nach 12, 24, 36 und 48 Stunden hergestellt.

Abbildung 21 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte Apoptoserate, in Abbildung 22 sind die entsprechenden Westernblots dargestellt.

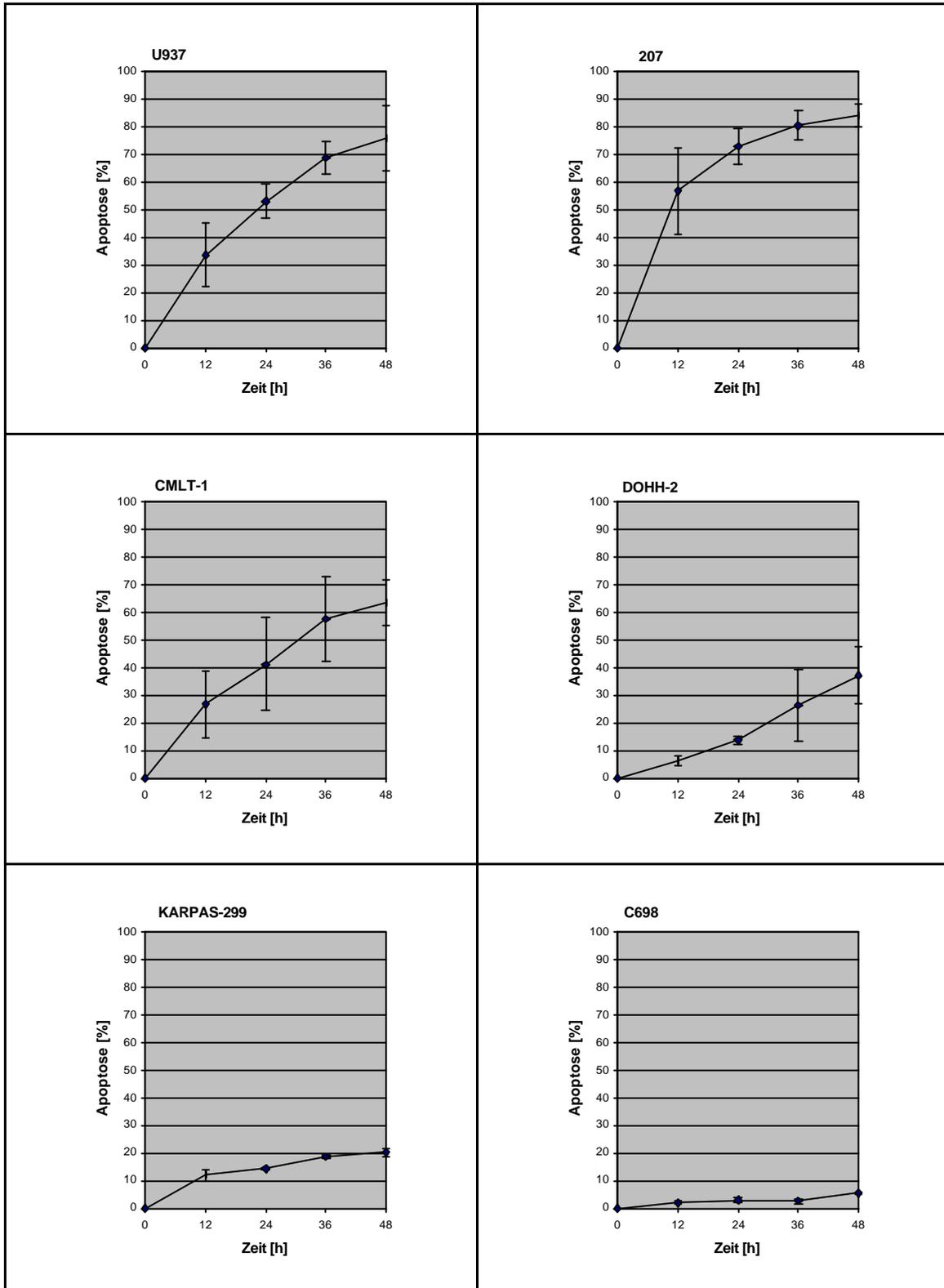


Abbildung 21: **Apoptoseinduktion in Lymphomzellen durch simultane Stimulation** mit 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy im Durchflusszytometer gemessen (n=3). Die Balken stellen die Standardabweichung dar.

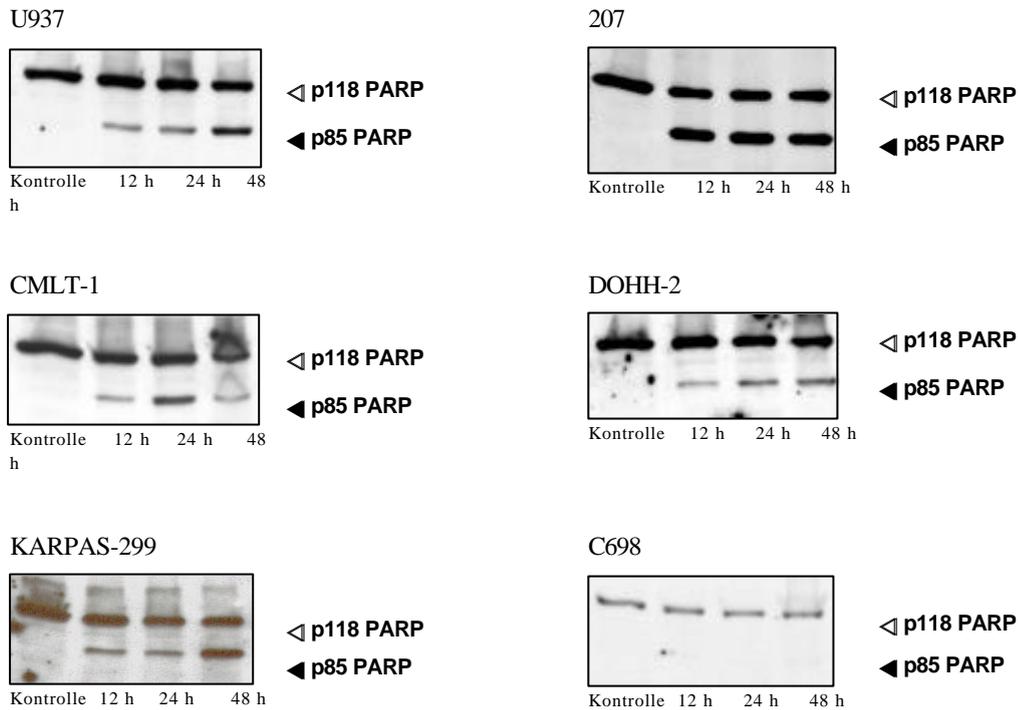


Abbildung 22: **Apoptoseinduktion in Lymphomzellen durch simultane Stimulation** mit 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy.  
(Kontrollen = unbehandelte Zellen)

Wie Abbildung 21 zeigt, führt die Kombination von TRAIL und Bestrahlung bei 207 zu einer erhöhten Apoptoserate von 84 % im Vergleich zur Behandlung mit nur einem Apoptosestimulus, bei der RT und TRAIL 54 % bzw. 59 % erzielten.

Ebenfalls bei U937 wird eine erhöhte Apoptoserate von 76 % (RT: 25 %, TRAIL: 62 %) erreicht.

CMLT-1 erreicht eine Apoptoserate von 63 % (RT: 44 %, TRAIL: 3 %) nach simultaner Kombination.

C698 reagiert auch bei einer Kombinationsbehandlung nur mit 6 % Apoptose (RT: 6 %, TRAIL: 0 %).

KARPAS-299 ändert seine Apoptoserate mit 20 % (RT: 16 %, TRAIL: 0 %) kaum und bei DOHH-2 führt die Kombination beider Stimuli sogar zu einer Verringerung der Apoptoserate auf 37 % (RT: 43 %, TRAIL: 0 %).

In den entsprechenden Westernblots der Abbildung 22 ist ein maximales PARP-Signal bei den Zelllinien 207 und U937 48 Stunden nach Kombinationsbehandlung zu erkennen. C698 zeigt auch nach 48 Stunden keinerlei Reaktion hinsichtlich der PARP-Spaltung.

CMLT-1 zeigt eine deutliche PARP-Aktivierung nach der kombinierten Stimulation. Besonders 48 Stunden nach der simultanen Kombinationsbehandlung ist bei KARPAS-299 eine deutliche PARP-Spaltung zu erkennen.

Das PARP-Signal von DOHH-2 ist nach alleiniger Bestrahlung stärker als nach Stimulierung mit TRAIL und 10 Gray.

In Tabelle 6 ist die Apoptoserate einer Kombinationsbehandlung in den verschiedenen Zelllinien dargestellt.

Tabelle 6: **Effekt der simultanen Kombinationsbehandlung in Lymphomzellen**  
(Werte in % Apoptose  $\pm$  Standardabweichung)

	RT 10 Gy 24 h	RT 10 Gy 48 h	TRAIL 24 h	TRAIL 48 h	Kombi 24 h	Kombi 48 h
U937	8 $\pm$ 1	25 $\pm$ 5	41 $\pm$ 9	62 $\pm$ 9	53 $\pm$ 8	75 $\pm$ 12
207	28 $\pm$ 10	54 $\pm$ 9	45 $\pm$ 9	59 $\pm$ 10	73 $\pm$ 7	84 $\pm$ 4
CMLT-1	27 $\pm$ 22	44 $\pm$ 21	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 4	40 $\pm$ 17	63 $\pm$ 9
KARPAS-299	5 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	1 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	20 $\pm$ 1
DOHH-2	16 $\pm$ 0	43 $\pm$ 5	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	38 $\pm$ 10
C698	3 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0

Besonders effektiv ist eine Kombinationsbehandlung nur bei CMLT-1. U937, 207 und KARPAS-299 weisen einen additiven Effekt auf, während DOHH-2 und C698 lediglich auf Bestrahlung reagieren.

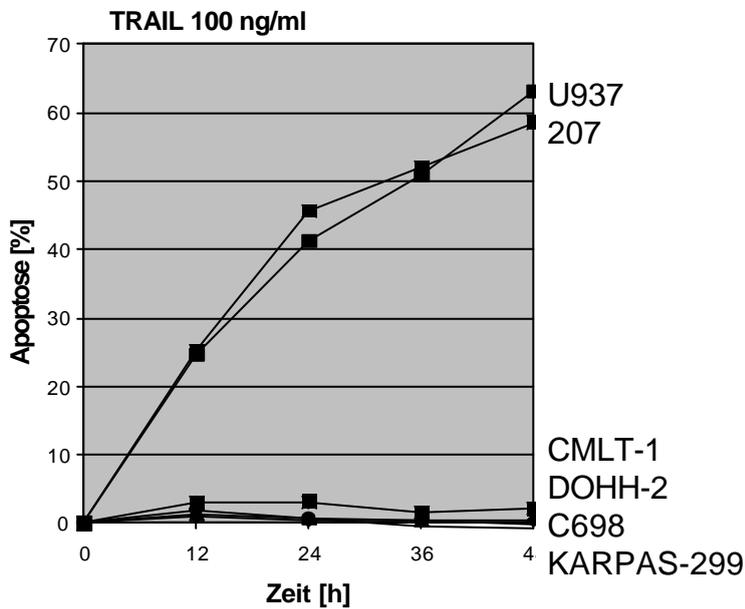
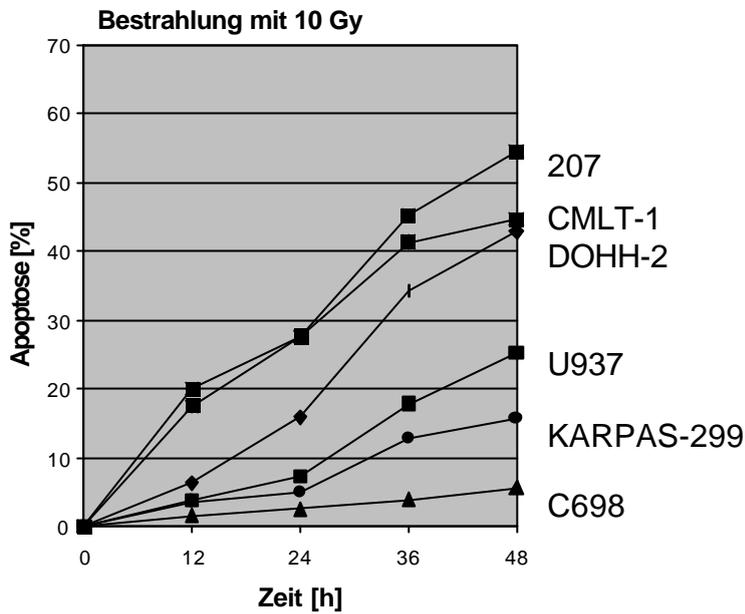


Abbildung 23: **Apoptoserate in verschiedenen Lymphomzelllinien** nach Bestrahlung mit 10 Gy bzw. nach Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL. (Vereinfachte Darstellung ohne Standardabweichung; Werte für Standardabweichung siehe Tabelle 6)

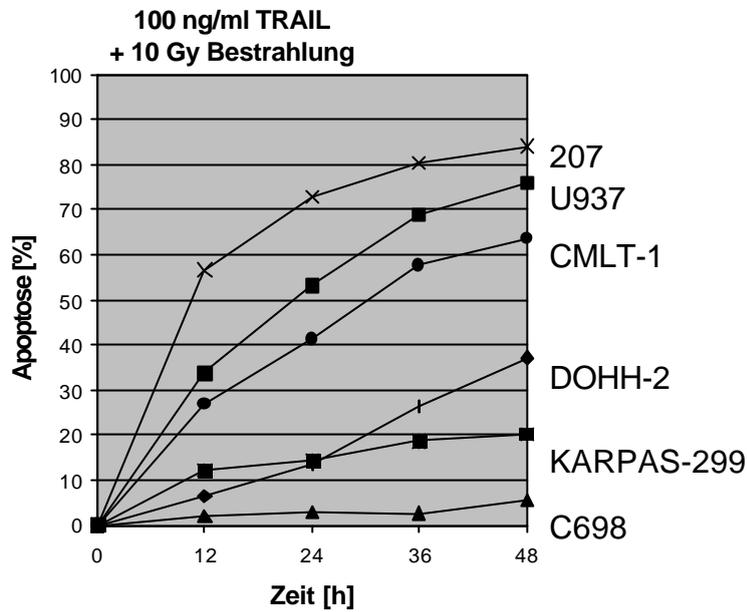


Abbildung 24: **Simultane Stimulation der Lymphomzellen** mit 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy Bestrahlung.  
(Vereinfachte Darstellung ohne Standardabweichung;  
Werte für Standardabweichung siehe Tabelle 6)

## **5. Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aufgrund unterschiedlicher Signaltransduktionswege nach Bestrahlung oder TRAIL-Behandlung nicht alle Lymphomzelllinien gleich sensibel auf TRAIL bzw. Bestrahlung reagieren. Während U937 und 207 eine hohe Apoptoserate nach TRAIL-Behandlung mit einem Apoptosemaximum nach 48 Stunden zeigen, entziehen sich C698, DOHH-2 und KARPAS-299 der TRAIL-vermittelten Apoptose völlig. CMLT-1 zeigt fast keine Apoptose nach TRAIL-Stimulation (4 %), wohl aber nach Bestrahlung mit 10 Gray nach 48 Stunden (44 %). Interessanter Weise ist dies die einzige Zelllinie, die einen mehr als additiven Effekt bezüglich Apoptoseinduktion nach Simultanbehandlung (63 %) aufweist.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich nicht alle Lymphomzellen durch TRAIL abtöten lassen. Diese unterschiedlichen Apoptoseraten sind nicht durch ein Fehlen der agonistischen TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche oder von Caspase-8, -3 und FADD zu erklären, da alle Zelllinien zumindest einen agonistischen TRAIL-Rezeptor exprimieren (siehe auch Kapitel 4.1). Ferner kann aufgezeigt werden, dass auch in primär sensiblen Zelllinien TRAIL-resistente Zellen vorhanden sind.

Anders verhält es sich mit den Apoptoseraten nach Bestrahlung in denselben Zelllinien: 207, DOHH-2 und CMLT-1 zeigen die höchste Apoptoserate, U937 und KARPAS-299 reagieren kaum und C698 ist völlig resistent gegenüber Bestrahlung.

TRAIL-vermittelte Apoptose und bestrahlungsinduzierte Apoptose laufen über unterschiedliche Wege wie in Kapitel 1.5 bereits beschrieben.

Stress-induzierte Apoptose wird vor allem über den mitochondrialen Weg und eine Cytochrom-c-Freisetzung vermittelt. Anschließend werden Caspase-9 und die folgende Caspasenkaskade aktiviert. Caspase-8 ist für den bestrahlungsindu-

zierten Zelltod nicht unbedingt erforderlich. TRAIL-vermittelte Apoptose führt hingegen vor allem zu einer direkten Aktivierung von Caspase-8 und der folgenden Caspasenkaskade. Die unterschiedlichen Wege der Aktivierung des apoptotischen Programms durch bestimmte Stressoren oder durch TRAIL erklären auch die Tatsache, warum dieselbe Zelllinie auf Bestrahlung oder rezeptorvermittelte Apoptose unterschiedlich reagiert.

Mit einer kombinierten Behandlung wurde untersucht, ob eine Kombination beider Stimuli, also Bestrahlung und TRAIL, zu erhöhten Apoptoseraten über die Aktivierung beider Apoptosewege führt.

Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch im Westernblot sind bei 207, U937 und vor allem CMLT-1 eine deutlich erhöhte Apoptoserate zu erkennen, bei KARPAS-299 ändert sich die Apoptoserate nur minimal und C698 zeigt selbst bei kombinierter Behandlung keinerlei Apoptose. Bei DOHH-2 ist sogar eine Verringerung der Apoptoserate als nach alleiniger Bestrahlung nachweisbar.

## **5.1 Wirkungsweise von TRAIL**

Die Bindung von TRAIL führt ähnlich wie bei CD95 zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Nach der anschließenden Bindung von FADD wird Procaspase-8 autoproteolytisch aktiviert. Nun erfolgt die weitere proteolytische Aktivierung der Caspasenkaskade (siehe Abbildung 25).

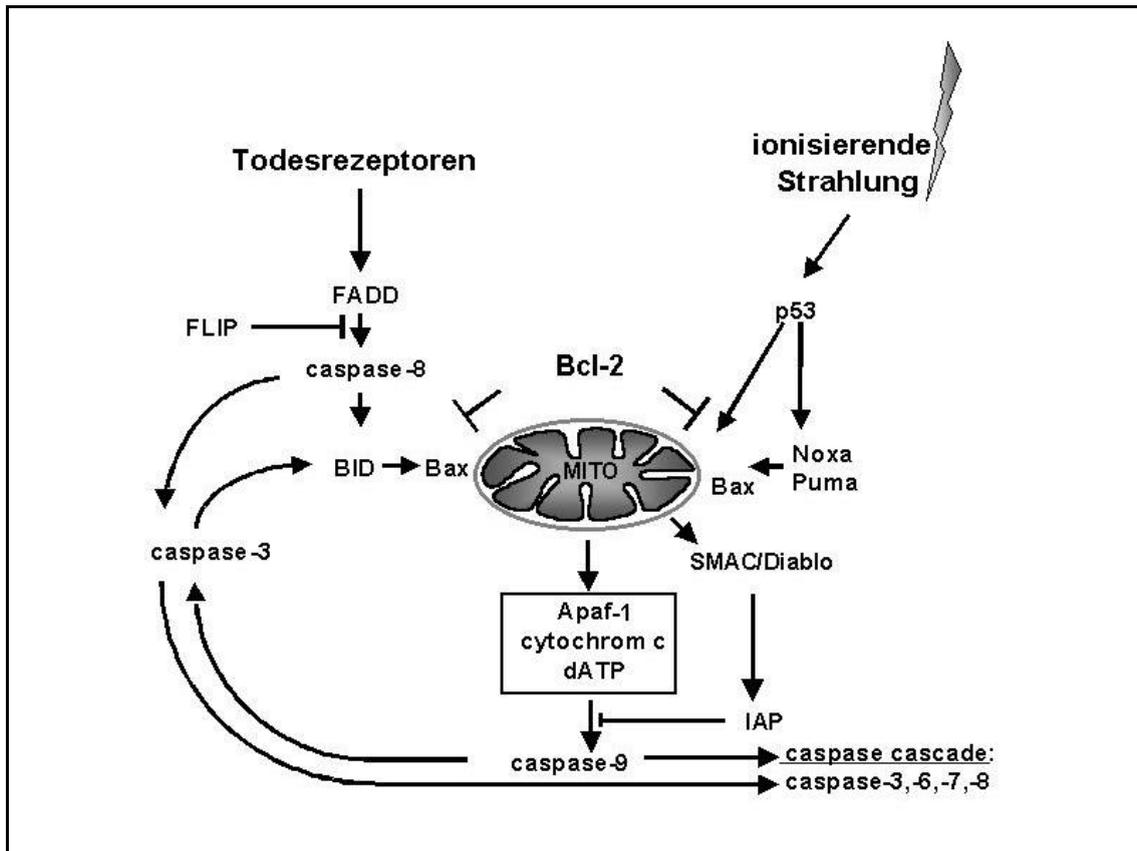


Abbildung 25: Modell der beiden Apoptosewege (nach Marini, Belka 2003)

Caspase-8 galt als essentiell für die TRAIL-vermittelte Apoptose. Fehlt der T-Lymphomzelllinie Jurkat Caspase-8, werden die Zellen resistent gegenüber Fas-induzierter Apoptose.<sup>(75)</sup> Allerdings zeigte sich in nachfolgenden Untersuchungen, dass in Caspase-8-defizienten T-Zellen Apoptose möglich ist, wenn auch deutlich zeitverzögert. Dies ist möglicherweise auf die Aktivierung der alternativen Initiatorcaspase-10 zurückzuführen, die ähnlich wie die Caspase-8 aufgebaut ist.<sup>(76)</sup>

Vorübergehend war die Rolle von FADD als Adapterprotein in der TRAIL-vermittelten Apoptose unklar. Yeh et al. berichteten über Zellreihen, in denen die Apoptose durch dominant negatives FADD blockiert wurde, während in Fibroblasten von FADD-negativen Mäusen eine Überexpression von TRAIL-R1 zur Induktion von Apoptose führte.<sup>(77)</sup>

Derzeit ist davon auszugehen, dass FADD das einzige Adapterprotein darstellt. <sup>(78),(79)</sup>

Im Westernblot in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass alle sechs verwendeten Lymphomzelllinien sowohl Caspase-8 als auch das Adapterprotein FADD exprimieren, so dass fehlendes FADD nicht als Ursache der TRAIL-Resistenz von DOHH-2, C698, CMLT-1 und KARPAS-299 in Frage kommt. Ferner wurde nachgewiesen, dass auf allen untersuchten Zellen entweder TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 oder beide Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind.

Ebenfalls konnte eine Expression von Pro-Caspase-3 in den unbehandelten Zellen im Westernblot abgeleitet werden.

Wie bereits in Kapitel 1.5 dargestellt und in Vorversuchen nachgewiesen, gibt es neben dem Rezeptor-vermittelten einen zweiten mitochondrialen Weg, den wesentlichen Apoptose-Weg nach zellulärem Stress, der nach TRAIL-Stimulation lediglich der Verstärkung dient. Nach Behandlung mit TRAIL kommt es nach Bid-Spaltung zur Induktion sowohl des Zelltodrezeptor-vermittelten als auch des mitochondrialen Weges. Beide Wege münden in die Aktivierung der proteolytischen Caspasenkaskade. Insbesondere die Spaltung von Caspase-3 stellt einen Schlüsselschritt als gemeinsame „Einmündungsstelle“ beider Wege dar (Abbildung 10, siehe auch Kapitel 1.5).

Im Westernblot wurde eine Spaltung von PARP (ein Substrat der Caspase-3 und Endpunktmarker der Apoptoseinduktion durch beide Wege) nachgewiesen.

PARP wird zum Beispiel in der TRAIL- und RT-resistenten Zelllinie C698 nicht, in der RT-sensiblen CMLT-1-Linie nur nach Bestrahlung oder kombinierter Stimulation gespalten. 207 und U937 zeigen sowohl nach alleiniger Stimulation mit TRAIL oder Bestrahlung als auch nach kombinierter Behandlung eine PARP-Spaltung. Je stärker die Apoptoserate, desto stärker ist die PARP-Spaltung. Man muss somit davon ausgehen, dass PARP einen entscheidenden sensitiven Parameter der Ausführung der Apoptose in den Zelllinien darstellt. Die Spaltung von PARP zu 89kDa zeigt deutlich, dass es sich hierbei tatsächlich um Apoptose handelt und

nicht um Nekrose, bei der nur größere und kleinere Fragmente nachweisbar sind.<sup>(80)</sup>

Neben der Induktion von Apoptose durch Caspasenspaltung führt TRAIL zur Aktivierung von spezifischen Kinasen in Lymphomzellen.<sup>(81)</sup> Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Proteinkinasen (SAPK, JNK), die durch Stress (toxische Substanzen, Bestrahlung) aktiviert wird und Apoptose bewirkt. Innerhalb der Kaskade aktivieren sich die Kinasen gegenseitig und leiten das apoptotische Signal in den Zellkern. In menschlichen Lymphomzellen sind FADD und Caspasen ebenfalls für diesen Weg erforderlich,<sup>(82)</sup> wogegen eine Caspasen- und FADD-unabhängige Aktivierung nach TRAIL-Stimulation in anderen Zelllinien nachgewiesen wurde.<sup>(83)</sup> Allerdings zeigte sich auch, dass alleinige Aktivierung des JNK/SAPK-Systems nicht in der Lage ist, nach TRAIL-Stimulation in FADD-negativen Zellen Apoptose auszulösen.<sup>(84)</sup> Daher bleibt weiterhin unklar, inwieweit die TRAIL-vermittelte Aktivierung des JNK/SAPK-Systems unterstützend auf die zelltodvermittelte Apoptose durch Caspasen-Aktivierung wirkt. Verheij et al. beschreiben neben TRAIL zahlreiche weitere Faktoren, die zu einer Aktivierung des JNK/SAPK-Systems führen. Dazu gehört auch Ceramid, das durch ionisierende Strahlung aus Sphingomyelin entsteht. Es besteht somit die Möglichkeit, dass durch TRAIL-vermittelte Aktivierung der Stress-Kinasefamilie der Zelltod durch ionisierende Strahlung verstärkt wird.

Ferner führt TRAIL neben der Induktion von Apoptose zur Aktivierung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B<sup>(85)</sup> über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (siehe Kapitel 1.5.2.2).<sup>(86)</sup> Nach Bindung von TRAIL an den TRAIL-Rezeptor kommt es über die Adapterproteine RIP,<sup>(87)</sup> TRAF-2 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor)<sup>(88)</sup> und c-E10,<sup>(89)</sup> das an den TRAIL-Rezeptor 1 (DR4) über TRADD bindet, zur Aktivierung der Kinase NAK<sup>(90)</sup> (NF-kappaB-activating kinase). Die durch NAK aktivierte  $\kappa$ B-Kinase besteht aus den drei Untereinheiten IKKalpha, IKKbeta und IKKgamma, wobei die beiden erstgenannten zur Interaktion mit TRAF-2 notwendig sind.<sup>(91)</sup> IKK phosphoryliert den NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B, der nun dem Abbau durch Ubiquitin zugänglich wird.<sup>(92)</sup> NF $\kappa$ B wird freigegeben und trans-

loziert in den Kern.<sup>(93)</sup> FADD und Procaspase-8 sind notwendig zur rezeptorvermittelten NF $\kappa$ B-Aktivierung, während Caspase-8 durch Proteolyse von NAK diese herunterregulieren kann.<sup>(94)</sup> Jeremias et al. konnten zeigen, dass die Hemmung der TRAIL-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Zellen sensibler für TRAIL-vermittelte Apoptose macht.<sup>(92)</sup> Dies erklärt jedoch nicht, warum es in Zellen zu unterschiedlicher NF $\kappa$ B-Aktivierung und damit zu unterschiedlicher Resistenz kommt. Einen möglichen Erklärungsansatz lieferten Kothny-Wilkes et al. In Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass NF $\kappa$ B nach Stimulation mit dem Zytokin Interleukin-1 (IL-1) auf TRAIL-Rezeptor unabhängige Weise aktiviert wird und die Zellen dadurch vor TRAIL-vermittelter Apoptose schützt. Kothny-Wilkes et al. postulieren, dass manche Tumoren IL-1 sezernieren und sich durch diesen Mechanismus der Apoptose entziehen.<sup>(118)</sup>

## **5.2 Veränderungen der TRAIL-Sensibilität**

Die meisten gesunden Gewebe zeigen eine natürliche TRAIL-Resistenz, aber auch einige Tumoren entgehen der Apoptose nach TRAIL-Stimulation. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die Zellen sich der Apoptose durch TRAIL entziehen.

Ein Erklärungsmodell greift die unterschiedlichen TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1/TRID) und TRAIL-R4 (DcR2) auf. Sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 induzieren offensichtlich Apoptose.<sup>(95)</sup> Die R1-negativen FaDu-Nasopharyngeal-Carcinom-Zellen sind TRAIL-resistent.<sup>(96)</sup> Die sogenannten Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 dagegen besitzen keine zytoplasmatische Domäne. Sie kompetieren mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 um die TRAIL-Bindung und verhindern somit die Induktion von Apoptose.<sup>(97)</sup> Obwohl alle von uns untersuchten Lymphomzellen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 exprimieren, sind nicht alle sensibel auf TRAIL, was durch das Vorhandensein von Decoy-Rezeptoren erklärt werden könnte.

Gegen dieses Modell spricht, dass auch TRAIL-sensibles Hirngewebe Decoy-Rezeptoren exprimiert.<sup>(98)</sup> Bestimmte Zelllinien bei Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose sind TRAIL-resistent unabhängig von der TRAIL-R3- und TRAIL-R4-Expression und auch eine erhöhte TRAIL-R1- und TRAIL-R2-Expression führt nicht zu einer erhöhten TRAIL-Sensibilität in diesen Zellen.<sup>(99)</sup> Die meisten Melanomzellen zeigen eine hohe Korrelation zwischen der Apoptoserate und der Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2, ein geringer Anteil allerdings ist TRAIL-resistent, obwohl er keine Decoy-Rezeptoren besitzt,<sup>(100)</sup> bzw. ist TRAIL-sensibel trotz vorhandener Decoy-Rezeptoren. Mikroskopisch wurde eine falsche Lokalisation der Decoy-Rezeptoren als mögliche Ursache der fehlenden Korrelation festgestellt: Nach TRAIL-Stimulation wandern TRAIL-R1 und TRAIL-R2 aus dem Golgi-Apparat in die Endosomen und signalisieren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 die Wanderung vom Kern ins Zytoplasma und zur Zellmembran. Eine „falsche Positio-

nierung“ der Decoy-Rezeptoren führt zum Verlust der Hemmung der Apoptoseinduktion.<sup>(101)</sup>

Da sich durch die vorhandenen TRAIL-Rezeptoren allein die unterschiedliche Ansprechbarkeit der Zellen auf TRAIL nicht erklären lässt, müssen auch andere Faktoren eine Rolle in der Entwicklung einer TRAIL-Resistenz spielen.

Die TRAIL-R1- und TRAIL-R2-vermittelte Apoptose ist FADD-abhängig.<sup>(102)</sup> Mäuse, denen FADD fehlt, zeigen keine Apoptose nach TRAIL-Stimulation.<sup>(103)</sup>

Die für diese Arbeit verwendeten Lymphomzellen exprimieren FADD.

Wie bereits unter Kapitel 5.1 erwähnt, wird nach TRAIL-Stimulation das anti-apoptotische NF $\kappa$ B aktiviert.<sup>(104)</sup> Dieses bewirkt die Transkription anti-apoptotischer Gene wie A20 oder Mitglieder der IAP-Familie, die wiederum die Apoptose über eine Hemmung bestimmter Caspasen verhindern.<sup>(105)</sup> Eine unterschiedliche Aktivierung der an der NF $\kappa$ B-Stimulation beteiligten Faktoren wie NAK oder I $\kappa$ B oder von NF $\kappa$ B selbst spielen somit eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Lymphomen<sup>(106)</sup> durch Ausbildung einer Resistenz gegenüber TRAIL. Wird NF $\kappa$ B in B-Lymphomzellen<sup>(107)</sup> und Brustkrebszellen<sup>(108)</sup> gehemmt, kommt es zur Erhöhung der Apoptoserate nach TRAIL-Stimulation.<sup>(109)</sup> Gegen dieses Modell spricht die Tatsache, dass eine NF $\kappa$ B-Aktivierung sowohl über die Decoyrezeptoren als auch über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 erfolgt.<sup>(110)</sup> Unklar bleibt auch, warum es zur unterschiedlichen Aktivierung von NF $\kappa$ B in den Zellen kommt. Auch IL-1 wird als Aktivator von NF $\kappa$ B beschrieben, so dass manche Tumoren sich durch IL-1-Sezernierung unabhängig von TRAIL vor der TRAIL-vermittelten Apoptose schützen könnten.<sup>(111)</sup>

Hu et al. postulieren aber, dass die NF $\kappa$ B-Aktivierung allein nicht ausreichend ist, um TRAIL-vermittelte Apoptose zu verhindern.<sup>(112)</sup>

Somit muss es noch weitere Einflüsse bei der Entwicklung der TRAIL-Resistenz geben. Man entdeckte die sogenannten FLIP's (FLICE-inhibitory proteins), die durch kompetitive Hemmung von Caspase-8, -3 und FADD durch eine fehlende Cysteindomäne die TRAIL-induzierte Apoptose verhindern.<sup>(113)</sup> Leverkus et al.

konnten nachweisen, dass nach Transfektion eines FLIP-Vektors primär sensible Keratinozyten TRAIL-resistent werden und eine Hemmung der FLIPs mit Cycloheximid oder Actinomycin D die TRAIL-Sensibilität enorm erhöht.<sup>(114)</sup> Virale FLIPs können auch den NF $\kappa$ B-Weg beeinflussen durch Interaktion mit TRAF, RIP, NAK und I $\kappa$ B.<sup>(115)</sup> Clodi et al. jedoch fanden keine Korrelation zwischen der FLIP-Expression und der TRAIL-Sensibilität in B-Zell-Leukämiezellen.<sup>(116)</sup>

### **5.3 Veränderungen der Sensibilität auf Bestrahlung**

Eine entscheidende Rolle im mitochondrialen Apoptoseweg spielen die pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine. In Vorversuchen mit Jurkat-Zellen wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Bcl-2 sowohl die bestrahlungsinduzierte Apoptose als auch die mitochondriale Depolarisation fast vollständig hemmt, im Gegensatz zu den Bcl-2-negativen Kontrollzellen. Eine Überexpression von Bcl-2 in Lymphomzellen macht diese nicht nur strahlenresistent sondern verschlechtert zusätzlich die Prognose der Erkrankung enorm.

Bedeutend ist auch der Einfluss von p53 auf die bestrahlungsinduzierte Apoptose. Der Tumorsuppressor p53 aktiviert das pro-apoptotische Bax-Protein und setzt dadurch den mitochondrialen Apoptoseweg durch ionisierende Strahlung in Gang. Zusätzlich reguliert p53 die Expression des anti-apoptotischen Bcl-x<sub>L</sub>, dessen Aktivierung p53-abhängig ist und die Zelle vor der p53-induzierten Apoptose schützen kann.<sup>(117)</sup>

### **5.4 Klinische Bedeutung der Wirkung von TRAIL, Bestrahlung und der Kombination beider Behandlungsmethoden**

TRAIL stellt einen vielversprechenden Ansatz in zukünftigen Therapiekonzepten dar, denn es induziert Apoptose in einem weiten Spektrum von menschlichen Carcinomzellen ohne relevante Schädigung des Normalgewebes. Ashkenazi et al. und

Walczak et al. zeigen, dass die alleinige TRAIL-Gabe im Affenmodell und in der Maus im Gegensatz zu FasL- und TNF $\alpha$ -Injektionen zu keiner Toxizität im Sinne von Leberzelldegeneration oder septischen Schock führt. Dagegen bewirkt TRAIL in soliden menschlichen Tumoren im Mausmodell sowohl die Induktion von Apoptose, Tumorsuppression als auch eine Verlängerung der Lebenserwartung. Bei kleinen Tumoren unterhalb der Größe von 4mm konnte sogar eine vollständige Heilung erzielt werden.<sup>(118),(119)</sup>

Leider kommt es in größeren Tumoren trotz in vitro nachgewiesener TRAIL-Sensibilität zum Rezidiv in den behandelten Tieren. Die Feststellung, dass TRAIL in isolierten menschlichen Leberzellen (nicht aber im Lebergewebe von Affe und Maus) in vivo Apoptose induziert und somit lebertoxisch für den Menschen sein könnte, erschütterte kurzfristig den Enthusiasmus gegenüber TRAIL.<sup>(120),(121)</sup> Allerdings zeigten Saiura und Lawrence, dass verschiedene rekombinante TRAIL-Versionen eine sehr unterschiedliche Zelltoxizität besitzen.<sup>(122)</sup> Es wurde ein rekombinantes TRAIL.0 entwickelt, das selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml nur minimale apoptotische Veränderungen in isolierten menschlichen Hepatozyten zeigt.<sup>(123)</sup> Intravenöse Injektionen im Affen wurden gut toleriert: Körpergewicht, Ernährungsweise, Gerinnungsparameter, Leber- und Urinanalyse, Leberenzyme, Bilirubin, Albumin und die Histologie aller großen Organe waren völlig normal. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch TRAIL bei kleineren TRAIL-sensitiven Malignomen eine Heilung und bei größeren Tumoren lediglich eine Wachstumsverzögerung bewirkt werden kann. Eine alleinige Anwendung von TRAIL scheint daher nicht ausreichend, da in jedem TRAIL-sensiblen Gewebe auch resistente Zellen vorhanden zu sein scheinen oder TRAIL nicht bis in die schlecht durchbluteten Gebiete größerer Tumoren gelangt.

Eine alleinige Behandlung mit ionisierender Strahlung ist ebenfalls limitiert: Je höher die gewählte Strahlendosis ist, desto größer ist die Aussicht auf Heilung. Desto höher wird aber auch das Risiko, die Normalgewebstoleranz zu überschreiten und das gesunde Gewebe zu schädigen.

In den diese Arbeit begleitenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Kombination ionisierender Strahlung und TRAIL in den Zelllinien U937, 207 und CMLT-1 zu additiven und wahrscheinlich bei CMLT-1 auch zu synergistischen Apoptoseeffekten führt. Somit kann der gleiche Therapieerfolg mit einer niedrigeren Strahlendosis erreicht werden bei simultaner Stimulation mit TRAIL, ohne die Normalgewebstoleranzen zu überschreiten. Auch Apoptoseresistenzen zum Beispiel durch p53-Mutationen oder Bcl-2-Überexpressionen können überwunden und die Effektivität der Behandlung mit ionisierender Strahlung verbessert werden.

## **6. Zusammenfassung**

Die Inzidenz der Leukämien und Lymphome ist mit 30 Fällen auf 100.000 Personen pro Jahr immer noch sehr hoch. Mit den bisherigen Therapiekonzepten sind bislang keine befriedigenden Ergebnisse erzielt worden.

Durch Kombination von Bestrahlung mit neuen Behandlungsmethoden können Resistenzen überwunden und Normalgewebe geschont werden.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit TRAIL, ein neues Mitglied der TNF-Genfamilie, und Bestrahlung gesondert auf sechs verschiedene Lymphom- und Leukämiezelllinien untersucht. Beide Behandlungsmethoden führen über getrennte Wege zum Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials  $\Delta\Psi_m$  und zur Aktivierung von Caspase-8, Caspase-3, Bid und PARP in den sensiblen Zelllinien.

Es wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten Zellen die erforderlichen TRAIL-Rezeptoren exprimieren. Dennoch wird nur in den Zelllinien 207, U937 und CMLT-1 durch TRAIL Apoptose in unterschiedlicher Stärke induziert.

Anders verhält es sich bei Bestrahlung. Hier reagieren alle Zelllinien mit Apoptose in unterschiedlicher Stärke außer C698 mit  $< 10\%$ .

Im Westernblot konnten die Ergebnisse mittels PARP-Spaltung korreliert werden. PARP wird als „gemeinsame Endstrecke“ über beide diskutierten Signaltransduktionswege mittels Caspasen gespalten. Sind die Zelllinien resistent, erfolgt keine Spaltung.

Diese Resistenzen erschweren die Behandlung im klinischen Alltag und der Therapieerfolg bleibt aus. Durch Kombination der beiden Stimuli wurde überprüft, ob es zu additiven Effekten kommt. Dies konnte bei U937, 207 und CMLT-1 nachgewiesen werden.

Die Bestrahlung könnte durch eine Heraufregulation der TRAIL-Rezeptoren zu einer höheren Apoptoserate nach TRAIL-Behandlung führen. Eine Vorbestrahlung der Zellen und nachfolgende Stimulation führt gegenüber simultaner Behandlung

mit TRAIL und Bestrahlung zu keiner Steigerung der Apoptoserate.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von TRAIL und Bestrahlung bei einigen Leukämie- und Lymphomzelllinien zum verstärkten Zelltod führt. Diese Behandlungsweise könnte zur verstärkten Tumorelimination bei besserer Verträglichkeit führen unter Umgehung der Resistenzmechanismen der einzelnen Zelllinien. Eine höhere Lebensqualität oder gar eine potentielle Heilung Erkrankter könnte das Ergebnis sein.

Dieser vielversprechende Ansatz sollte in zukünftigen klinischen Studien überprüft werden.

---

## Quellenverzeichnis

- <sup>1</sup> Schlungbaum, W., 1993. Strahlentherapie. In Schlungbaum, W., Flesch, U., Stabell, U.: Medizinische Strahlenkunde, 7. Aufl., de Gruyter, Berlin.
- <sup>2</sup> Dunne-Daly, C. F. 1999. Principles of radiotherapy and radiobiology. *Semin. Oncol. Nurs.* 15: 250-259
- <sup>3</sup> Steel, G. G. 1993. Introduction: The significance of radiobiology for radiotherapy. In *Basic clinical Radiobiology*, pp. 1-7. Edward Arnold, Boston.
- <sup>4</sup> Steel, G. G. and McMillan, T. J. 1993. Molecular aspects of radiation biology. In Steel, G. G., ed., *Basic clinical Radiobiology*, pp. 211-233. Edward Arnold, Boston.
- <sup>5</sup> Gerschenson, L. E. and Rotello, R. J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6: 2450-2455.
- <sup>6</sup> Schlungbaum, W., 1993. Strahlentherapie. In Schlungbaum, W., Flesch, U., Stabell, U.: Medizinische Strahlenkunde, 7. Aufl., de Gruyter, Berlin.
- <sup>7</sup> Kliche, K.-O., Clement, J. H., and Höffken, K. 1999. Apoptose: Mechanismen, Regulation und therapeutische Modulation als klinische Perspektive. *Der Onkologe* 5: 891-897.
- <sup>8</sup> Bergmann, A., Agapite, J., and Steller, H. 1998. Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates. *Oncogene* 17: 3215-3223.
- <sup>9</sup> Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. In *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- <sup>10</sup> Desoize, B., Sen, S. 1992. Apoptosis or programmed cell death: concepts, mechanisms and contribution in oncology. *Bull Cancer* 79 ( 5 ): 413-425.
- <sup>11</sup> Carson, D. A., Ribeiro, J. M. 1993. Apoptosis and disease. In *Lancet* 341: 1251-1254.
- <sup>12</sup> Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. In *Cancer* 73: 2013-2026.
- <sup>13</sup> Schlungbaum, W., 1993. Strahlentherapie. In Schlungbaum, W., Flesch, U., Stabell, U.: Medizinische Strahlenkunde, 7. Aufl., de Gruyter, Berlin.
- <sup>14</sup> Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 75: 641-652.
- <sup>15</sup> Yuan, J., Horvitz, H. R. 1992. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116: 309-320.
- <sup>16</sup> Hengartner, M., Ellis, R. E., and Horvitz, H. R. 1992. *C. elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499.
- <sup>17</sup> Shaham, S., and Horvitz, H. 1996. Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes & Dev.* 10: 578-591.
- <sup>18</sup> Zou, H., Henzel, W., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413.

- 
- <sup>19</sup> Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelop, endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53: 4701-4714.
- <sup>20</sup> Reed, J. C. 1995. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins and ist role in cancer and chemoresistance. *Curr. Opin. Oncol.* 7: 541-546.
- <sup>21</sup> Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14486-14491
- <sup>22</sup> Nicholson, D. W., and Thornberry, N. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 299-306
- <sup>23</sup> Nicholson, D. W. 1996. ICE/CED-3-like proteases as therapeutics targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature Biotechnol.* 14: 297-301.
- <sup>24</sup> Wilson, K. P., Black, J.-A. F., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., and Livingston, D. J. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Nature* 370: 270-275.
- <sup>25</sup> Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mamkovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D., and Wong, W. W. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 272: 9677-9682.
- <sup>26</sup> Cryns, V., and Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551-1570.
- <sup>27</sup> Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815.
- <sup>28</sup> Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270: 7795-7798.
- <sup>29</sup> Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* 22:155-156.
- <sup>30</sup> Stroh, Christopher and Schulze-Osthoff, Klaus. 1998. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 5: 997-1000.
- <sup>31</sup> Hill, M. E., MacLennan, K. A., Cunningham, D. C., Vaughan, H. B., Burke, M., Clarke, P., Di Stefano, F., Anderson, L., Vaughan, H. G., Mason, D., Selby, P., and Linch, D. C. 1996. Prognostic significance of Bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 88: 1046-1051.
- <sup>32</sup> Tsujimoto Y., Finger L. R., Yunis J., Nowell P. C., Croce C. M. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 226: 1440-1443.
- <sup>33</sup> Cory, S., Adams, J. M. 2001. Life-or-death decicions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26: 61-66.

- 
- <sup>34</sup> Krajewski, S., Krajewska, M., Ehrmann, J., Sikorska, M., Lach, B., Chatten, J., and Reed, J. C. 1997. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am. J. Pathol.* 150: 805-814.
- <sup>35</sup> Reed, J. C. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776.
- <sup>36</sup> Soengas, M. S., Alarcon, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W., Lowe, S. W. 1999. Apaf-1 and Caspase-9 in p53-Dependent Apoptosis and Tumor Inhibition. *Science* 284: 156-159.
- <sup>37</sup> Miyashita, T. and Reed, J. C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299.
- <sup>38</sup> Narita, M., Shimizu, M., Ito, T., et al. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14681-14686.
- <sup>39</sup> Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, K. G. 1998. *Science* 281: 2027-2031.
- <sup>40</sup> Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14681-14686.
- <sup>41</sup> Kroemer, G. 1999. Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem. Soc. Symp. (England)* 66: 1-15.
- <sup>42</sup> Cai, J., Yang, J., Jones, D. P. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochem. Biophys. Acta (Netherlands)* 1366: 139-149.
- <sup>43</sup> Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., et al. 2000. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett. (Netherlands)* 476: 118-123.
- <sup>44</sup> Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- <sup>45</sup> Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. 1999. An APAF-1 Cytochrome-c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274: 11549-11556.
- <sup>46</sup> Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome-c. *Cell* 86: 147-157.
- <sup>47</sup> Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., and Martin, S. J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases -2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell. Biol.* 144: 281-292.
- <sup>48</sup> Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D. M., Martin, S. J., Cotter, T. G., Salvesen, G. S., and Green, D. R. 1998. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ.* 5: 298-306.

- 
- <sup>49</sup> Wallach, D., Boldin, M., Goncharov, T., Goltsev, Y., Mett, I., Malinin, N., Adar, R., Kovalenko, A., and Varfolomeev, E. 1996. Exploring cell death mechanisms by analyzing signaling cascades of the TNF/NGF receptor family. *Behring Inst. Mitt.*: 144-155.
- <sup>50</sup> McNally, J., Yoo, D. H., Drappa, J., Chu, J. L., Yagita, H., Friedman, S. M., and Elkon, K. B. 1997. Fas ligand expression and function in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 159: 4628-4636.
- <sup>51</sup> Drappa, J., Vaishnav, A. K., Sullivan, K. E., Chu, J. L., and Elkon, K. B. 1996. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity (see comments). *N. Engl. J. Med.* 335: 1643-1649.
- <sup>52</sup> Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., el Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z., and Marshak, R. A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation (see comments). *Nature* 373: 444-448.
- <sup>53</sup> Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- <sup>54</sup> Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shvchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827.
- <sup>55</sup> Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17: 1675-1687.
- <sup>56</sup> Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X. X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Green, D. R., Reed, J. C., Froelich, C. J., and Salvesen, G. S. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 273: 27084-27090.
- <sup>57</sup> Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., and Sasada, M. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 187: 587-600.
- <sup>58</sup> Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. 1998. Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
- <sup>59</sup> Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132.
- <sup>60</sup> Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity (USA)*: 673-682.
- <sup>61</sup> Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178.
- <sup>62</sup> Pitti, R. M., et al. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor receptor family. *J. Biol. Chem.* 271: 111-113.

- 
- <sup>63</sup> Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276: 111-113.
- <sup>64</sup> Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., et al. 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell. Biol. (England)* 3: 409-416.
- <sup>65</sup> Jeremias, I., Debatin, K. M. 1998. TRAIL induces apoptosis and activation of NFκB. *Eur. Cytokine Netw. (France)* 9: 687-688.
- <sup>66</sup> Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., et al. 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell. Biol. (England)* 3: 409-416.
- <sup>67</sup> Marsters, S., et al. 1996. Apo3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-κB. *Curr. Biol.* 6: 1669-1676.
- <sup>68</sup> Schneider, P., Bodmer, J. L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., and Tschopp, J. 1997. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett.* 416: 329-334.
- <sup>69</sup> Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.-L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. 1997. TRAIL Receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-κB. *Immunity* 7: 831-836.
- <sup>70</sup> Sheridan, J. P., et al. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277: 818-821.
- <sup>71</sup> MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen G. M., and Alnemri, E. S. 1997. Identification and Molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *The J. of Biol. Chem.* 41: 25417-25420.
- <sup>72</sup> Marsters, S., et al. 1996. Apo3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-κB. *Curr. Biol.* 6: 1669-1676.
- <sup>73</sup> Naumann, U., Wick, W., Beschorner, R., Meyermann, R., Weller, M. 2003. Expression and functional activity of osteoprotegerin in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berlin)* 2003
- <sup>74</sup> Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. 1999. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo (see comments). *Nat. Med.* 5: 157-163.
- <sup>75</sup> Jou, P., Kuo, C. J., Yuan, J., Blenis, J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8: 1001-1008.
- <sup>76</sup> Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A. 2001. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *J. Biol Chem.* 276:46639-46646.

- 
- <sup>77</sup> Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.JI, Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V., and Mak, T.W. 1998. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279: 1954-1958.
- <sup>78</sup> Kischkel, F.C., Lawrence, D.A. Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., Ashkenazi, A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620.
- <sup>79</sup> Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E. Rausch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., Walczak, H. 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12: 599-609.
- <sup>80</sup> Shah, G. M., Shah, R. G., Poirier, G. G. 1996. Different cleavage pattern for poly (ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 838-844.
- <sup>81</sup> Herr, I., Wilhelm, D., Meyer, E., Jeremias, I., Angel, P., Debatin, K. M. 1999. JNK/SAPK activity contributes to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 130-135.
- <sup>82</sup> Shah, G. M., Shah, R. G., Poirier, G. G. 1996. Different cleavage pattern for poly (ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 838-844.
- <sup>83</sup> Muhlenbeck, F., Haas, E., Schwenzer, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., and Wajant, H. 1998. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 273: 33091-33098.
- <sup>84</sup> Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., Debatin, K. M: 1999. JNK/SAPK activity is not sufficient for anticancer therapy-induced apoptosis involving CD95-L, TRAIL and TNF-alpha. *Int. J. Cancer* 80: 417-424.
- <sup>85</sup> Jeremias, I. and Debatin, K. M. 1998. TRAIL induces apoptosis and activation of NFkappaB. *Eur. Cytokine Netw. (FRANCE)* 9: 687-688.
- <sup>86</sup> Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 30603-30610.
- <sup>87</sup> McCarthy, J. V., Ni, J., and Dixit, V. M. 1998. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 16968-16975.
- <sup>88</sup> Wajant, H., and Scheurich, P.2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and ist role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 19-32.
- <sup>89</sup> Constanzo, A., Guiet, C., Vito, P. 1999. C-E10 is a caspase-recruiting domain-containing protein that interacts with components of death receptors signaling pathway and activates nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274: 20127-20132.
- <sup>90</sup> Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., Nakanishi, M. 2000. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404: 778-782.

- 
- <sup>91</sup> Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M., and Liu, Z. G. 2001. The alpha and beta Subunits of IkkappaB Kinase (IKK) Mediate TRAF-2-Dependent IKK Recruitment to Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1 in Response to TNF. *Mol. Cell Biol.* 21: 3986-3994.
- <sup>92</sup> Tu, Z., Kelley, V. R., Collins, T., and Lee, F. S. 2001. IkkappaB kinase is critical for TNF-alpha-induced VCAM1 gene expression in renal tubular epithelial cells. *J. Immunol.* 166: 6839-6846.
- <sup>93</sup> Roff, M., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Jacque, J. M., Baleux, F. 1996. Role of IkkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. *J. Biol. Chem.* 271: 7844-7850.
- <sup>94</sup> Hu, W. H., Johnson, H., Shu, H. B. 2000. Activation of NFkappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J. Biol. Chem.* 275: 10838-10844.
- <sup>95</sup> Pan, G., O'Rourke, K., Chinnayan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276: 111-113.
- <sup>96</sup> Ozoren, N., Fisher, M. J., Kim, K., Liu, C. X., Genin, A., Shifman, Y., Dicker, D. T., Spinner, N. B., Lisitsyn, N. A., and El-Deiry, W. S. 2000. Homozygous deletion of the death receptor DR4 gene in a nasopharyngeal cancer cell line is associated with TRAIL resistance. *Int. J. Oncol.* 16: 917-925.
- <sup>97</sup> Pan, G., Ni, J., Wie, Y.-F., Yu, G.-L., Gentz, R., and Dixit, V. M. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain containing receptor for TRAIL. *Science* 277: 815-818.
- <sup>98</sup> Frank, S., Kohler, U., Schackert, G., and Schackert, H. K. 1999. Expression of TRAIL and its receptors in human brain tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 454-459.
- <sup>99</sup> Wendling, U., Walczak, H., Dorr, J., Jacobi, C., Weller, M., Krammer, P. H., and Zipp, F. 2000. Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *Cell Death Differ.* 7: 637-644.
- <sup>100</sup> Zhang, X. D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T., and Hersey, P. 1999. Relation of TNF-related apoptosis -inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* 59: 2747-2753.
- <sup>101</sup> Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Gray, C. P., and Hersey, P. 2000. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J. Immunol.* 164: 3961-3970.
- <sup>102</sup> Marini, P., Jendrossek, V., Durand, E., Gruber, C., Budach, W., Belka, C. 2003. Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionising radiation. *Radiotherapy & Oncology* 68: 189-198.
- <sup>103</sup> Kuang, A. A., Diehl, G. E., Zhang, J., Winoto, A. 2000. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275: 25065-25068.
- <sup>104</sup> McCarthy, J. V., Ni, J., and Dixit, V. M. 1998. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 16968-16975.

- 
- <sup>105</sup> Hofer-Warbinek, R., Schmid, J. A., Stehlik, C., Binder, B. R., Lipp, J., and deMartin, R. 2000. Activation of NF-kappaB by XIAP, the X chromosome inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J. Biol. Chem.* 275: 22064-22068.
- <sup>106</sup> Ciana, P., Neri, A., Cappellini, C., Cavallo, F., Pomati, M., Chang, C. C., Maiolo, A. T., and Lombardi, L. 1997. Constitutive expression of lymphoma-associated NFKB-2/Lyt-10 proteins is tumorigenic in murine fibroblasts. *Oncogene* 14: 1805-1810.
- <sup>107</sup> Wu, M., Lee, H., Bellas, R. E., Schauer, S. L., Arsura, M., Katz, D., Fitz Gerald, M. J., Rothstein, T. L., Sherr, D. H., und Sonenshein, G. E. 1996. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 15: 4682-4690.
- <sup>108</sup> Keane, M. M., Rubinstein, Y., Cuello, M., Ettenberg, S. A., Banerjee, P., Nau, M. M., and Lipkowitz, S. 2001. Inhibition of NF-kappaB activity enhances TRAIL mediated apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 64: 211-219.
- <sup>109</sup> Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T., Debatin, K. M. 1998. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 91: 4624-4631.
- <sup>110</sup> Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo (see comments). *Nat. Med.* 5: 157-163.
- <sup>111</sup> Kothny, W. G., Kulms, D., Poppelmann, B., Luger, T. A., Kubin, M., and Schwarz, T. 1998. Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Biol. Chem.* 273: 29247-29253.
- <sup>112</sup> Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 30603-30610.
- <sup>113</sup> Yoshikawa, H., Nakajima, Y., Tasaka, K. 2000. Enhanced expression of Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein induces resistance to Fas-mediated apoptosis in activated mast cells. *J. Immunol.* 165: 6262-6269.
- <sup>114</sup> Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C. T., Brocker, E. B., Krammer, P. H., and Walczak, H. 2000. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* 60: 553-559.
- <sup>115</sup> Chaudhary, P. M., Jasmin, A., Eby, M. T., and Hood, L. 1999. Modulation of the NF-kappaB pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene* 18: 5738-5746.
- <sup>116</sup> Clodi, K., Wimmer, D., Li, Y., Goodwin, R., Jaeger, U., Mann, G., Gadner, H., and Younes, A. 2000. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors and sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary B-cell acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 111: 580-586.
- <sup>117</sup> Zhan, Q., Alamo, I., Yu, K., Boise, L. H., Cherney, B., Tosato, G., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J. 1996. The apoptosis-associated gamma-ray response of BCL-X(L) depends on normal p53 function. *Oncogene* 13: 2287-2293.

- 
- <sup>118</sup> Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., and Schwall, R. H. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104: 155-162.
- <sup>119</sup> Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo (see comments). *Nat. Med.* 5: 157-163.
- <sup>120</sup> Jo, M., Kim, T. H., Seol, D. W., Esplen, J. E., Dorko, K., Billiar, T. R., and Strom, S. C. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* 6: 564-567.
- <sup>121</sup> Nagata, S. 2000. Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat. Med.* 6: 502-503.
- <sup>122</sup> Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., and Makuuchi, M. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* 4: 383-385.
- <sup>123</sup> LeBlanc, H.N., Ashkenazi, A. 2002. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death and Differentiation* 10: 66-75.

## **Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Privatdozent. Dr. C. Belka für die Überlassung des interessanten Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung.

Herzlichen Dank auch an das Laborteam, insbesondere Heidi Faltin, sowie an die Mitarbeiter der Strahlentherapie für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Bedienung der Linearbeschleuniger.

Patrizia Marini danke ich herzlich für die Durchsicht des Manuskripts und Martin Hitzel für die Unterstützung am PC.

**Lebenslauf**

01.03.1976	<b>Geburtsdatum</b>
Athen (Griechenland)	<b>Geburtsort</b>
ledig	<b>Familienstand</b>
deutsch	<b>Nationalität</b>
	<b>Schulbildung</b>
Grundschule in Athen	<b>1981 - 1985</b>
Grundschule in Freudenstadt	<b>1985 - 1987</b>
Kepler-Gymnasium in Freudenstadt	<b>1987 - 1996</b>
	<b>Studium</b>
Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock Abschluss des vorklinischen Studienabschnitts mit dem Physikum	<b>Oktober 1996 - September 1998</b>
Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Universität Tübingen	<b>seit Oktober 1998</b>
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	<b>13.04.2000</b>
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	<b>19.03. / 02.04.2002</b>
Praktisches Jahr im Marienhospital Stuttgart mit dem Wahlfach Anästhesie und Intensivmedizin	<b>29.04.2002 - 30.03.2003</b>
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	<b>09.05.2003</b>
Assistenzärztin im Krankenhaus Bietigheim Gastroenterologische Abteilung der Inneren Medizin	<b>01.06.2003 - 30.04.2005</b>
Assistenzärztin im Diakonieklinikum Stuttgart Chirurgische Abteilung	<b>seit 01.05.2005</b>