

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

**Kombinationswirkung der agonistischen TRAIL-
Rezeptorantikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 und
Bestrahlung in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro***

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

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

**vorgelegt von
Stefanie Denzinger
aus
Stuttgart**

2009

Dekan: Professor Dr. I.B.Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Belka

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. V. Jendrossek

***„Der Kampf gegen Gipfel vermag ein Menschenherz
auszufüllen. Wir müssen uns Sisyphus als einen glücklichen
Menschen vorstellen.“***

**Albert Camus (Der Mythos des Sisyphos. Ein Versuch über
das Absurde.)**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Molekularbiologische Aspekte der Strahlentherapie	1
1.2 Zelltod.....	2
1.2.1 Nekrose vs Apoptose.....	3
1.3 Der Mechanismus der Apoptose- beteiligte Moleküle.....	4
1.3.1 Caspasen.....	5
1.3.2 Das Bcl-2 Protein und verwandte Proteine	8
1.4 Regulation des apoptotischen Programms	10
1.5 Der intrinsische Apoptoseweg	13
1.6 Der extrinsische Apoptoseweg: Die TNF-Rezeptorfamilie	14
1.6.1 DR4., DR5- das TRAIL-System	15
1.7 Der Einsatz von TRAIL in der Onkologie	17
1.8 Themenstellung	20
2 Material	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Puffer und Lösungen	22
2.3 Verbrauchsmaterial	24
2.4 Antikörper und Liganden	24
2.5 Zelllinien	25
2.6 Geräte	25
3 Methoden.....	26
3.1 Zellkulturen	26
3.2 Nachweis von Proteinen.....	26
3.2.1 Bestimmung der Zellzahl und Herstellung der Zellysate.....	26
3.2.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	27

3.2.3	Westernblot	28
3.3	Messung von Zelltod	29
3.3.1	Hoechst-Färbung	29
3.4	Koloniebildungstests	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung oder HGS-ETR1 bzw. HGS-ETR2	31
4.1.1	Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1	36
4.1.2	Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2	39
4.1.3	Apoptoseinduktion durch Kombination der beiden Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2	43
4.2	Kombination von Antikörpergabe und Bestrahlung	47
4.3	Untersuchung zur Beeinflussung der Kombinationswirkung durch Vorbestrahlung	57
4.4	Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung durch ionisierende Strahlung oder agonistische TRAIL-Antikörper	62
4.5	Einfluss von Bax auf die Kombinationsbehandlung	63
4.6	Auswirkung der Kombinationsbehandlung mit agonistischen TRAIL-Antikörpern und Bestrahlung auf das klonogene Überleben	65
5	Diskussion	68
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	68
5.2	„Molecular targeting“, Kombination mehrerer Therapieansätze	69
5.3	Die Rolle von Bax	70
5.4	In-vivo- Modelle	71
5.5	Ausblick	72
6	Zusammenfassung	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang	85

Abkürzungen

A	Ampère
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor
Bcl-2	B-cell-lymphoma/leucemia-2
Bid	BH 3 interacting domain death agonist
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Casp	Caspase
CD	cluster of differentiation
CD95-L = Fas	CD95-Ligand = Fas-Ligand
ced	Caenorhabditis elegans cell death gene
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacet
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell scan
FADD	fas-associating protein with death domain
Fas-R = CD95	Fas-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
Gy	Gray
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
ICAD	inhibitor of Caspase activated Dnase
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
NFκB	nuclear factor of κB
NGF = TNF	nerve growth factor
PARP	poly-(ADH-ribose) polymerase

SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TEMED	N,N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMRE	Tetramethylrhodaminmethylester
TNF = NGF	tumor necrosis factor
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor

1 Einleitung

Die Strahlentherapie ist neben der Chirurgie und der Chemotherapie ein Hauptbestandteil moderner multimodaler Tumorthераpiekonzepte(1). Über 50 % aller Patienten mit bösartigen Tumoren werden heute bereits mit ionisierender Strahlung behandelt. Resistenzmechanismen und Normalgewebstoxizität limitieren jedoch ihren Therapieerfolg. Mit Hilfe des „molecular targetings“, d.h. der zielgerichteten Intervention in der Tumorzelle auf molekularer Ebene, will man durch Kombination mit konventionellen Methoden wie der Strahlentherapie Resistenzen überwinden, die Effektivität steigern und die benötigte Dosis und damit die Normalgewebstoxizität reduzieren. Bei minimaler Schädigung des gesunden Gewebes, soll so im besten Fall der Tumor geheilt und eine hohe Lebensqualität erreicht werden.

1.1 Molekularbiologische Aspekte der Strahlentherapie

Strahlung lässt sich in Teilchen- oder Korpuskularstrahlung (Elektronen, Protonen und Neutronen) und Wellen- oder Quantenstrahlung einteilen.

Beide Strahlenarten wirken am biologischen Objekt entweder durch Ionisation, d.h. ein Elektron muss die Hülle verlassen oder durch Anregung, hierbei wird es auf ein höheres Energieniveau gehoben. In beiden Fällen findet eine Übertragung von Energie statt.

Was nun die genaue Wirkung der Strahlung am Zielmolekül anbelangt, so unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung.

Direkte Strahlenwirkung bedeutet, dass die Energie unmittelbar auf das Zielmolekül übertragen wird.

Bei der indirekten Strahlenwirkung kommt es zunächst zur Bildung freier Radikale (z. B. durch die Hydrolyse von Wasser). Diese freien Radikale schädigen dann das Zielmolekül.

Auf Zellebene sind vielfältige Strukturen (Enzyme, Membranen) von der Strahlenwirkung betroffen. Das Hauptziel der Strahlenwirkung bei der Zerstörung

einer Zelle ist jedoch die DNA. Dabei kommt es zu folgenden Läsionen: Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden und DNA- Protein-Verbindungen.

Die Bestrahlung mit nur einem Gray kann zwischen 4000 und 5000 DNA- Schäden in nur einer Zelle auslösen. Es gibt in jeder Zelle verschiedene Reperaturmechanismen, um diese DNA- Schäden zu beheben. Reichen diese Mechanismen nicht aus, so kann es u.a. zu Mutationen, maligner Transformation, Zelldifferenzierung (z.B. Fibrose) und zum Zelltod kommen(2).

1.2 Zelltod

Jede Form von Tumorthherapie hat den Tod der Krebszelle zum Ziel. Was den Zelltod angeht, so unterscheidet man primär zwischen Apoptose und Nekrose. Unter Nekrose versteht man den pathologischen Untergang einzelner oder mehrerer Zellen. Apoptose hingegen ist der physiologische Prozess, den ein Organismus benutzt, um selektiv Zellen auszulöschen, die nicht mehr gebraucht werden, beschädigt wurden oder gefährlich sind(3)

Durch hypoxische, toxische, physikalische oder immunologische Zellschädigung kommt es zur Nekrose, gekennzeichnet durch eine Vakuolisierung des Zellplasmas, Zusammenbruch der Plasmamembran und eine Entzündungsreaktion um die absterbende Zelle herum. Die Entzündungsreaktion ist durch die Freisetzung von Zellinhalt und proinflammatorischen Molekülen bedingt(4)

Apoptose (griech. apoptein herabfallen)- der so genannte programmierte Zelltod- führt hingegen nicht zu einer Entzündungsreaktion. Sie dient der Gewebshomöostase. Wird der komplexe Regulationsmechanismus der Apoptose gestört, so kommt es zu Entwicklungsdefekten, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen wie M.Alzheimer (5) und Chorea Huntington (6) und Krebs (7)

Apoptose und Nekrose können jedoch nicht immer klar von einander abgegrenzt werden. Zum Beispiel führt der Mangel an ATP dazu führen, dass ein apoptotischer Vorgang in einen nekrotischen übergeht (8)

1.2.1 Nekrose vs Apoptose

Morphologische Merkmale

Im Rahmen der Nekrose kommt es zu einer Anschwellung von Zytoplasma und Mitochondrien, die Zelle wird komplett lysiert, Organellen zerstört, die Membranintegrität geht verloren.

Bei der Apoptose hingegen kommt es zum so genannten „Blebbing“ der Zellmembran, die Membranintegrität selbst bleibt jedoch erhalten. Es werden Vesikel (apoptotic bodies) gebildet, das Chromatin kondensiert.

Biochemische Charakteristika

Nekrose stellt einen passiven ATP- unabhängigen Vorgang dar, der mit einem Verlust des Ionengleichgewichts einhergeht.

Währenddessen stellt die Apoptose einen streng regulierten Prozess dar, der nur unter ATP- Verbrauch ablaufen kann. Es kommt zur proteolytischen Aktivierung der Caspasen- Kaskade und zu einer Alteration der Membranasymmetrie wie z. B. der Translokation von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite der Membran (find me,eat me Signale) und triggert so die Reaktion der Phagozyten (9)

Physiologische Bedeutung

Die Nekrose stellt eine Reaktion auf unphysiologische Noxen wie Viren, Hypothermie, Hypoxie oder Ischämie etc. dar und ruft eine Entzündungsreaktion hervor. Es kommt zu einer Schädigung des Gewebes.

Die Apoptose hingegen wird durch physiologische Stimuli wie z. B. einen Mangel an Wachstumsfaktoren induziert. Es wird keine Entzündungsreaktion hervorgerufen.

Modifiziert nach (10).

1.3 Der Mechanismus der Apoptose- beteiligte Moleküle

Die Grundlage der Apoptoseforschung liegt in der Beobachtung der Vorgänge in der Embryonalentwicklung des Nematoden *C.elegans*. Als Organismus der zu Beginn seiner Entwicklung 1090 Zellen besitzt, von denen im Verlauf 131 Zellen durch Apoptose zugrunde gehen, ist er für die Erforschung des apoptotischen Programms prädestiniert.

So wurden sowohl pro- als auch antiapoptotische Gene entdeckt, denen homologe Gene im Säugetiergenom entsprechen. (11,12)

CED3 (*cenorrhaditis elegans cell death gene*) 3 entspricht der ICE- Protease (13) und ist in *C.elegans* für alle 131 Apoptosevorgänge essentiell. (14,15)

CED 4 entspricht APAF-1 (16)

CED5 entspricht Bcl-2 (17)

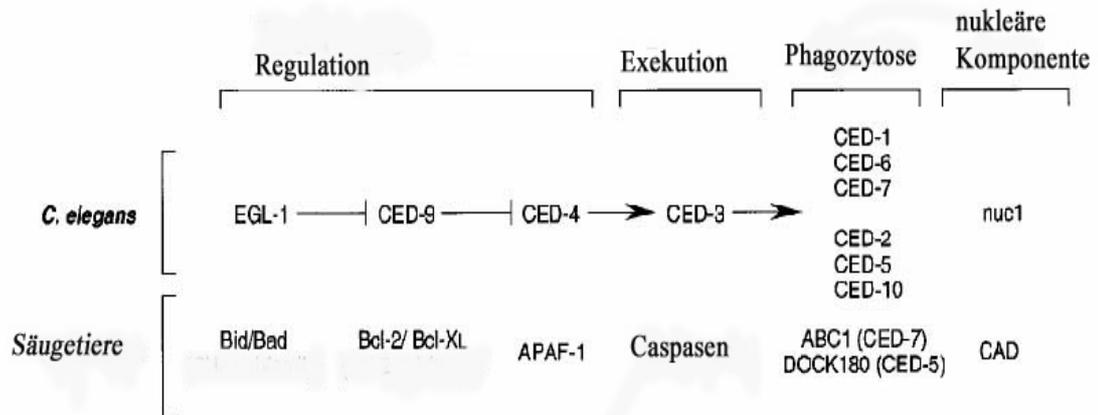


Abbildung 1: (nach Nicholson 1999) Vergleich der Komponenten des apoptotischen Programms bei *C.elegans* und bei Säugetieren

1.3.1 Caspasen

Prinzipiell unterscheidet man zwei distinkte Apoptosewege: den intrinsischen und den extrinsischen Apoptoseweg. Im intrinsischen Apoptoseweg wird Apoptose vorrangig durch eine Schädigung des Mitochondriums induziert, beim extrinsischen Apoptoseweg durch Stimulierung von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Beide Apoptoseweg führen schließlich zu einer Aktivierung der Caspasen (18). Caspasen gehören zu den ICE-Proteasen (interleucin 1 β -converting enzyme like proteases).

Es handelt sich um Cysteinproteasen mit einer Spezifität für Asparaginsäure. Bis jetzt wurden 14 verschiedene Säugetiercaspasen identifiziert. Man kann

inflammatorische (1,4,5,11,12,13,14) und Apoptose induzierende (2,8,9,10) und Effektorcaspasen der Apoptose (3,6,7) unterscheiden. In gesunden Zellen sind Caspasen als Zymogene, mit nur sehr niedriger enzymatischer Aktivität vorhanden. Die Aktivierung erfolgt entweder durch bereits aktivierte Caspasen oder durch autokatalytische Prozessierung durch Aggregation der Zymogene in einem Komplex mit Adaptorproteinen (19). Der Ablauf der Caspasenaktivierung erfolgt in einer streng geordneten Kaskade vergleichbar der Aktivierung des Gerinnungssystems oder des Komplementsystems.

Die Caspasenkaskade spielt eine essentielle Rolle bei der Apoptose. Die Caspasen sind dafür verantwortlich, dass die typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen stattfinden, die für den Vorgang der Apoptose charakteristisch sind.

Die Caspasensubstrate können grob in 4 verschiedene Hauptkategorien aufgeteilt werden: Mediatoren und Regulatoren der Apoptose, Strukturproteine, DNA-Reparaturproteine und Proteine, die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen (20).

So wird z. B. durch Caspase 8 das BH3-only-Protein Bid gespalten, dadurch aktiviert und so die Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptoseweg geschaffen.(21,22) Weitere Caspasensubstrate aus der Reihe der apoptotischen Proteine sind: DNA fragmentation factor 45 kD subunit (DFF45/ICAD)(22), NDUFS1, die 754kD - Untereinheit des Komplex 1 der Atmungskette (wird diese durch die Caspasen gespalten, so kommt es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und zur Unterbrechung des Elektronentransports)(23).

Durch die Caspasen vermittelte Spaltung der Strukturproteine kommt es zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen: die Spaltung von Fodrin und Gelsolin führt zu einer Zerstörung des Aktinfilamentnetzwerks (24), Intermediärfilamente werden gespalten(25), durch die Spaltung von β -Catenin und γ -Catenin werden Zell-Zellkontakte zerstört(26).

Eines der bekanntesten DNA-Reparaturproteine, das von Caspasen gespalten wird ist PARP (poly (ADP-ribose) polymerase)(27)

Zu den Caspasensubstraten gehören auch Zellzyklusproteine wie Cdc27, Wee1, p21 und p27 (28,29)

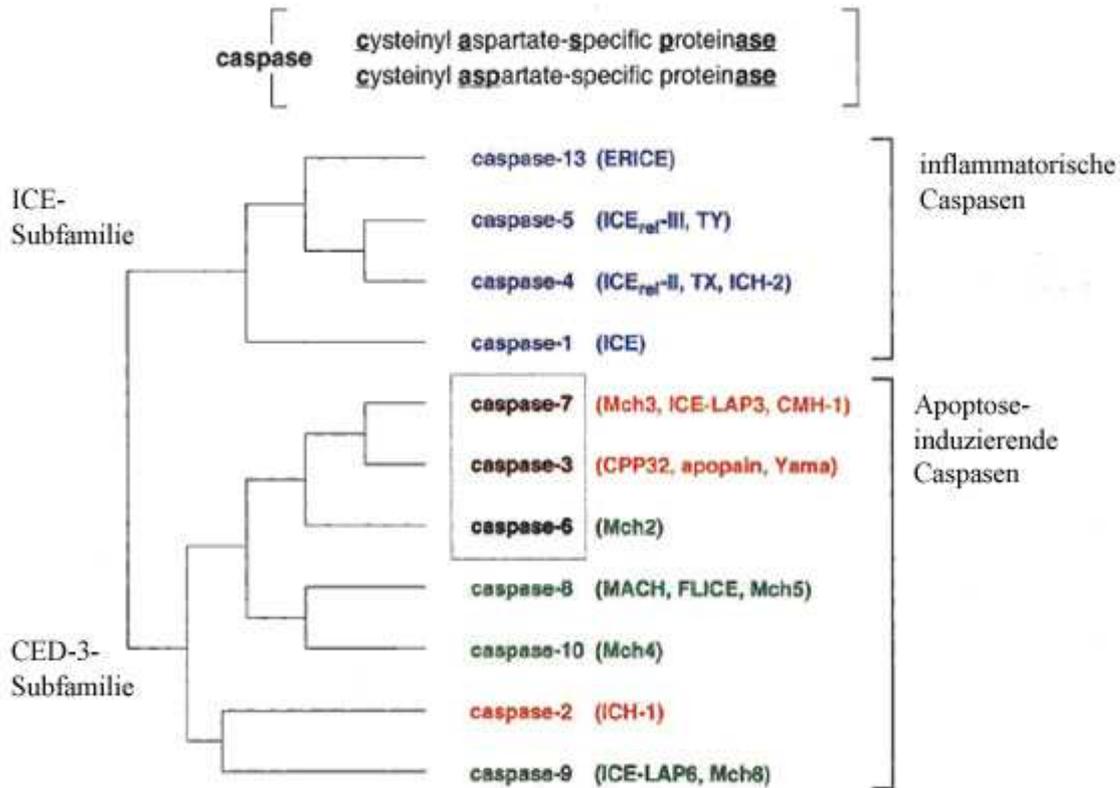


Abbildung 2:(nach Nicholson 1999)Darstellung der humanen Caspasenfamilie

Daneben gibt es noch die Gegenspieler der Caspasen, die so genannten IAPs (inhibitors of apoptosis): x-IAP, c-IAP-1, c-IAP-2, Survivin. Die IAPs wurden von Crook et al. entdeckt (30). Sie binden direkt an die Caspasen 9, 3, 7 und inaktivieren sie damit. Sie blockieren sowohl den mitochondrialen als auch den rezeptorvermittelten Apoptoseweg. Die IAPs selbst werden wiederum durch smac (second mitochondria derived factor of apoptosis), das auf apoptotische Stimuli hin aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, inaktiviert (31,32)

1.3.2 Das Bcl-2 Protein und verwandte Proteine

Das menschliche Protoonkogen Bcl-2 wurde erstmals 1988 von Vaux und Adams in B- Zell- Lymphomen beschrieben (33). Es weist eine Homologie zu Ced-9 aus *C. elegans* auf.

Heute kennt man eine ganze Bcl- 2 – Proteinfamilie, deren Mitglieder konservierte Motive, so genannte Bcl-2- Homologie- Domäne(BH1 bis BH4) gemein haben. (18)

Die Familie besitzt sowohl antiapoptotische, mit 3 oder 4 Homologie-Domänen (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w und A1) als auch proapoptotische Mitglieder: Bax, Bau, Bak (BH123), Mcl-1, bid, Bad und Bim. Pro- und antiapoptotische Bcl-2 Proteine inhibieren sich gegenseitig, ihr Gleichgewicht ist entscheidend dafür, ob eine Zelle in Apoptose geht oder nicht (34).

Die antiapoptotischen Proteine unterteilt man anhand ihrer Struktur in 2 Gruppen: Proteine, die 2 oder 3 BH- Domänen besitzen: Bax, Bak, Bcl-xs, Bok/Mtd und Bcl- gl und solche, die nur die kurze BH3- Domäne (BH3 only) besitzen: Bad, Bik/Nbk, Blk, Bid, Hrk/DP5, Bim/Bad, Bmf, Noxa, Puma, Pbc-3 (35). Über diese BH3- Domäne erfolgt die Bindung der BH3- only Proteine an die anderen proapoptotischen Proteine.

Ihre Aufgabe ist es, die Aktivität der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie zu verstärken (36). Nach der Spaltung durch Caspase 8 transloziert Bid ans Mitochondrium, aktiviert dort Bax und Bak und stellt so einen Mechanismus der Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptoseweg dar (21,22).

1993 wurde eines der ersten proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie von Korsmeyer et al. entdeckt: Bax (Bcl-2 Antagonist X) (37) Physiologisch spielt Bax eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung und in der Spermatogenese.

So weisen Bax- defiziente Tiere eine erhöhte Anzahl an Neuronen auf und männliche Tiere sind steril (38).

Bax befindet sich hauptsächlich im Cytosol, erst auf einen apoptotischen Stimulus hin, kommt es zur Translokation ans Mitochondrium (39). Hier kontrolliert Bax zusammen mit anderen Proteinen, die mehrere BH- Domänen (Multidomänenproteine: Bax, Bak, Bok) besitzen, die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von apoptotischen Proteinen wie Cytochrom c und Smac/ DIABLO. (40,41)

Mit ihren hydrophoben Aminosäuren am Carboxyterminus können sich die Multidomänproteine auch in die Membran des endoplasmatischen Retikulums integrieren. Über ihre Funktion hier weiß man nicht viel, sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} – Homöostase zu spielen (42).

Korsemeyer et al. konnten *in vivo* im Mausmodell zeigen, dass Bax eine wichtige Rolle bei der Apoptose von Nervenzellen spielt. Auch finden sich in den spinalen Motoneuronen erhöhte Bax Level (43).

Bax / Bak Doppelknockoutmäuse sind resistent gegen Apoptose über den mitochondrialen Weg. (44,45)

Das relative Verhältnis von antiapoptotischen zu proapoptotischen bcl-2 Proteinen bestimmt die Sensitivität einer Zelle gegenüber apoptogenen Stimuli entscheidend.

So korreliert bei der CLL die individuelle Variation der Expression von Bcl-2 / Bax mit der Apoptoserate der Lymphomzellen und dem klinischen Outcome des Patienten (46).

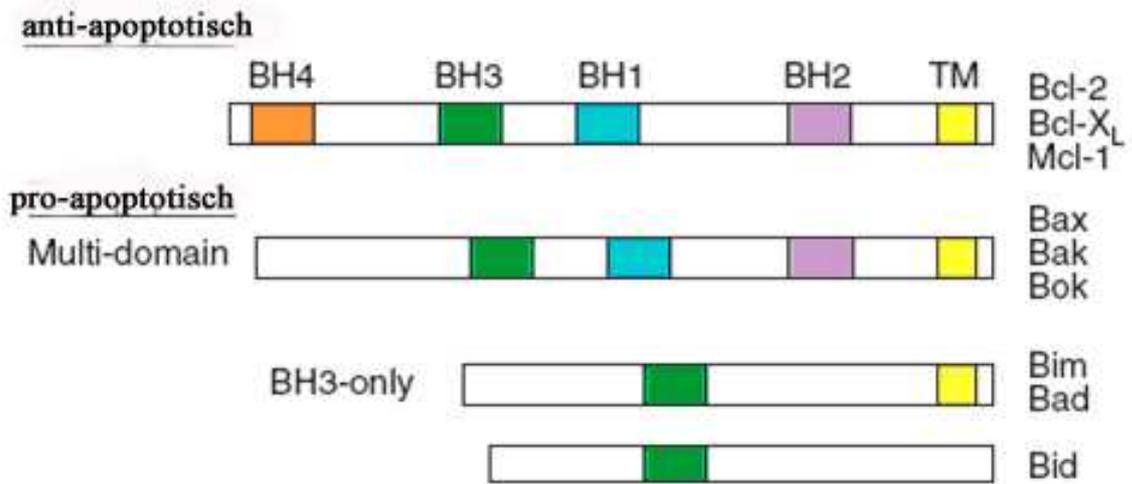


Abbildung 3: (nach Packham et al.2005) die Bcl-2 Proteinfamilie

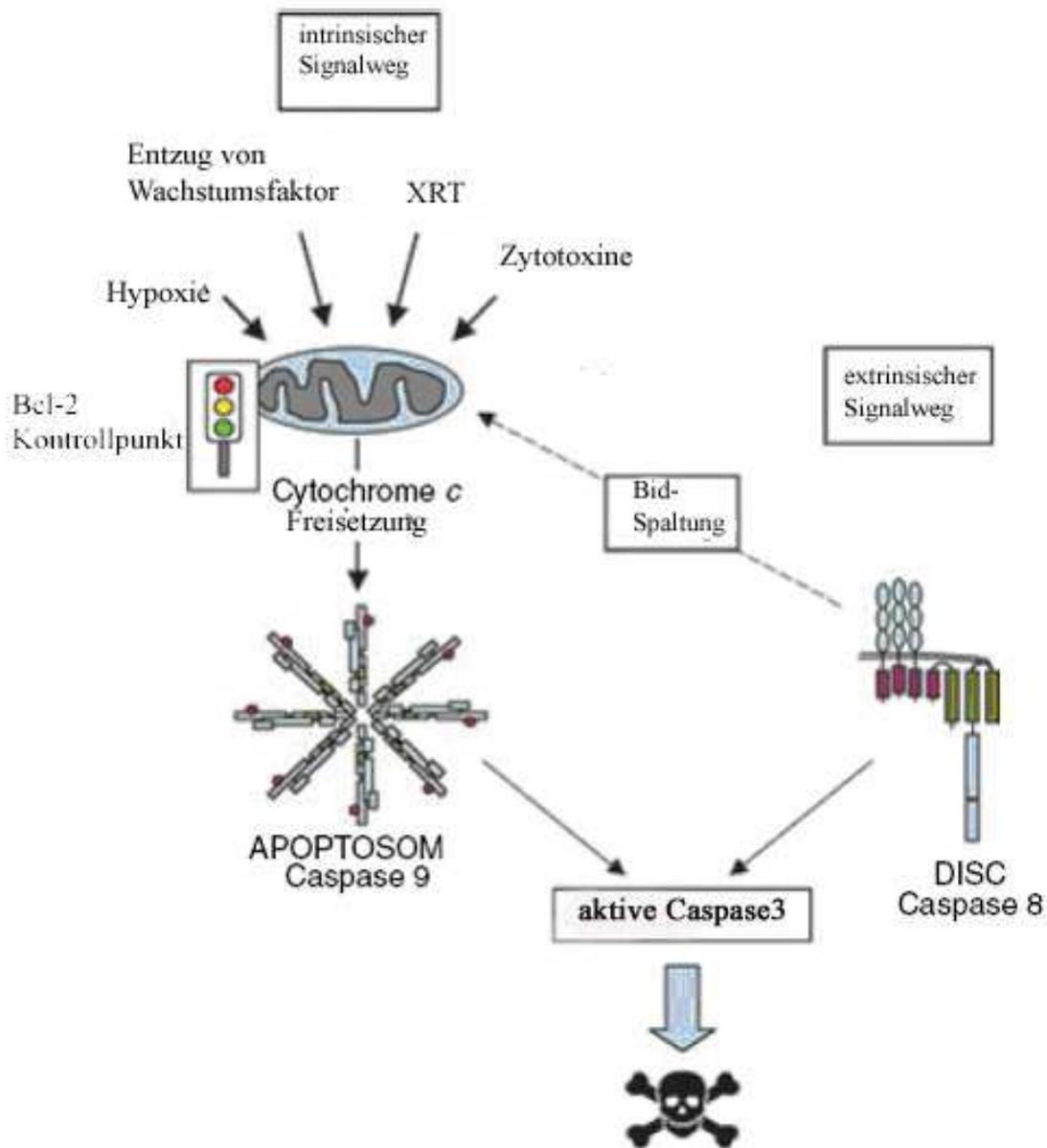


Abbildung 4: (nach Packham et al.2005) die Rolle der Bcl2- Proteine in der Apoptose

1.1 1.4 Regulation des apoptotischen Programms

Auf die Bedeutung der Apoptose für die Gewebshomöostase in einem Organismus und die möglicherweise fatalen Folgen eines gestörten Apoptoseablaufs wurde

schon mehrfach hingewiesen. Die Regulation dieses so bedeutenden Vorganges ist sehr komplex. Es gibt zahlreiche Stimuli, die zu Apoptose führen können.

Physiologische Aktivatoren:

- Mitglieder der TNF- Familie
- TGF- β
- Neurotransmitter wie Glutamat, Dopamin und NMDA
- Entzug von Wachstumsfaktoren
- Verlust von Zell- Zell- Kontakten
- Calcium
- Glukokorticoide

Aktivatoren im Zusammenhang mit Zellschäden:

- Hitzeschockproteine
- Virusinfektion
- Bakterielle Toxine
- Onkogene
- Tumorsuppressoren p 53
- Zytolytische T-Zellen
- Oxidantien
- Freie Radikale
- Entzug von Nährstoffen

Therapeutische Apoptoseaktivatoren:

- Chemotherapeutika
- Bestrahlung
- UV-Strahlung
- Toxine
- Ethanol

Physiologische Apoptoseinhibitoren:

- Wachstumsfaktoren

- Extrazelluläre Matrix
- CD 40 Ligand
- Neutrale Aminosäuren
- Zink
- Östrogen
- Androgene

Daneben gibt es noch verschiedene virale Gene, die die Apoptose inhibieren (Adenovirus E1B, Baculovirus p35, Baculovirus IAP, Epstein- Barr Virus BHRF-1, LMP-1)

(nach47,48, 49)

Signalwege der Apoptose

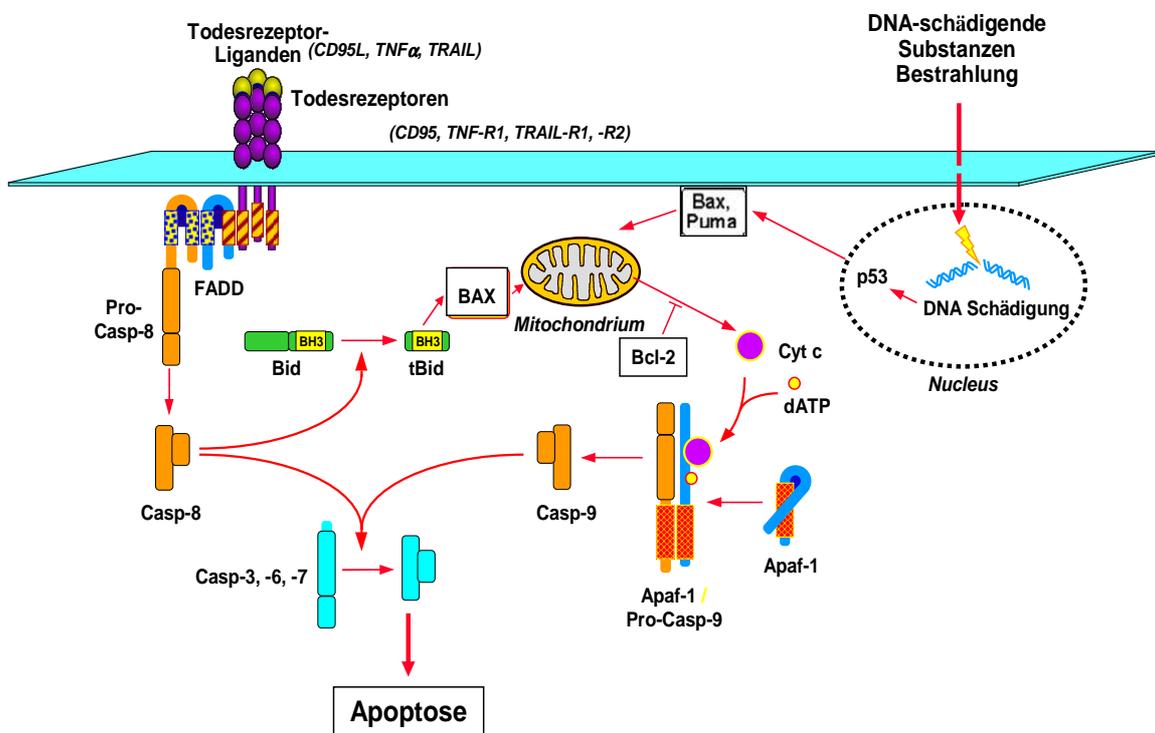


Abbildung 5: Darstellung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptosewegs sowie ihrer Verbindung

1.5 Der intrinsische Apoptoseweg

Strahlung induziert ebenso wie viele Chemotherapeutika Apoptose über den intrinsischen Weg. Auslösendes Ereignis ist hierbei die Schädigung der DNA, welche wiederum eine Aktivierung von p53 bewirkt. P 53 führt zu einer vermehrten Bax-Expression.

Bax transloziert zur äußeren Mitochondrienmembran und bewirkt hier zusammen mit Bak eine erhöhte Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran.

Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c.

Cytochrom c wiederum bindet unter ATP- Verbrauch an Apaf-1 und bildet so einen Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird.

Das Apoptosom rekrutiert Procaspase9 und aktiviert sie dabei. Die aktivierte Caspase 9 aktiviert dann die Effektorcaspasen 3,6 und 7., die dann für die Exekution der Apoptose sorgen.

Gleichzeitig werden aus dem Mitochondrium auch Smac (second mitochondria derived activator of caspases) / DIABLO (direct IAP binding protein with low pt) freigesetzt(50,51). Smac/ DIABLO beschleunigt die Aktivierung der Apoptose, indem es XIAP von den Caspasen entfernt (50).

Neben dem Mitochondrium spielt auch das endoplasmatische Retikulum (ER) eine Rolle im intrinsischen Apoptoseweg. Zum einen kann Stress am ER Apoptose

auslösen, zum anderen führt auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER ins Cytosol zur Aufnahme von Ca^{2+} ins Mitochondrium (51).

1.6 Der extrinsische Apoptoseweg: Die TNF- Rezeptorfamilie

Apoptose auf dem extrinsischen Weg wird durch die so genannten Zelltodrezeptoren und ihre Liganden der TNF- Rezeptorfamilie ausgelöst. Die Entdeckung der TNF- Rezeptorfamilie geht auf das Jahr 1868 zurück in dem der deutsche Arzt Brunes zum ersten Mal einen spontanen Tumorregress bei seinen Patienten nach akuter bakterieller Infektion beobachtete (52).

1975 wurde von E. Casswell und L. Old der Begriff des tumor necrosis factor eingeführt (53). Heute kennen wir eine ganze Rezeptorfamilie bestehend aus 18 Liganden und 28 Rezeptoren(54). Die TNF- Rezeptoren sind Typ1 Transmembranproteine. Die größte Homologie untereinander weisen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren auf. Hier finden sich zwischen 2 und 6 cysteinreiche Domänen.

Die Signalübertragung der TNF- Rezeptorfamilie läuft vom Grundmechanismus her folgendermaßen ab: 3 Rezeptoren binden ein trimeres Ligandenmolekül (55). Nach der Oligomerisierung der Rezeptoren werden das Adaptorpreotein FADD (Fas associated death domain) und Caspase 8 rekrutiert.FADD besteht aus einer Todesdomäne am Carboxyterminus und eine N-terminale Effektor-domäne(55) Sie bilden zusammen einen Komplex, den man als DISC (death inducing signalling complex) bezeichnet. An diesem Komplex wiederum kommt es zu einer Autoaktivierung von Caspase 8. Die Initiatorcaspase 8 führt zur Aktivierung der

Effektorcaspasen 3, 6 und 7. so wird die terminale Exekution des programmierten Zelltodes durch Spaltung einer Vielzahl unterschiedlicher Caspasen- Substrate eingeleitet (55).

Es existieren auch Verbindungen zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptoseweg:

Caspase 8 spaltet nachdem sie am DISC aktiviert wurde das proapoptotische Protein Bid (Mitglied der Bcl-2 Familie) und aktiviert es auf diese Weise(56) Bid wiederum interagiert mit Bax und Bak und führt so zur Freisetzung von Cytochrom c und SMAC/ DIABLO und anschließende Aktivierung von Caspase 9 und 3.

Umgekehrt kann durch Schädigung der DNA eine vermehrte Expression von Zelltodrezeptoren und Zelltodliganden wie z. B. Fas und DR5 induziert werden (57).

Man kann nun zwei Arten von Zellen unterscheiden:

Typ 1 –Zellen: bei ihnen reicht die Aktivierung von Caspase 8 am DISC aus, um Apoptose zu induzieren

Typ 2- Zellen: die Aktivierung von Caspase 8 allein reicht nicht für die Apoptoseinduktion aus, so dass der mitochondriale Weg für die endgültige Apoptoseinduktion notwendig ist. Bei Bcl-2- Überexpression ist in diesen Zellen keine Apoptose möglich(42). Es gibt eine so genannte Verstärkerschleife: Caspase 8 aktiviert Bid, dies führt zur Aktivierung von Caspase 9. Caspase 9 wiederum aktiviert Caspase3 und Caspase 3 schließlich aktiviert wieder Caspase 8 (58).

1.6.1 DR4, DR5- das TRAIL- System

Das TRAIL – System gehört zur TNF- Familie.

TRAIL wurde bei der Suche nach weniger toxischen Vertretern der TNF verwandten Proteine aufgrund seiner Sequenzhomologie zu Fas und TNF 1995 von Wiley und Piti entdeckt (59,60). TRAIL scheint eine vielfältige Rolle im Immunsystem zu

spielen. So zeigen TRAIL k.o. Mäuse eine beeinträchtigte Tumorüberwachung und eine höhere Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen, was auf eine physiologische Rolle im Immunsystem hinweist (61-63). Es ist auch bekannt, dass TRAIL durch Lymphozytenaktivierung hoch reguliert wird (64,65).

Die Hauptaufgabe von TRAIL besteht in der Apoptoseinduktion und in der Aktivierung von NF.κ-b.

TRAIL ist ein Typ 2 Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 33-35 kDa. Das TRAIL – Gen ist auf Chromosom 3 in Position 3q26 lokalisiert.

Die aktive Form von TRAIL ist ein Homotrimer, wobei ein Zink- Ion in jedem Monomer essentiell für die Aktivität ist .

Der erste bekannte TRAIL- Rezeptor war DR4 (TRAIL- R1)(66). Durch eine Datenbanksuche nach zu DR4 homologen Sequenzen wurde dann DR5 (TRICK-2/ KILLER/TRAIL-R2) entdeckt (67). Die Expression beider Rezeptoren kann durch p53 induziert werden. Mittlerweile sind noch weitere TRAIL- Rezeptoren bekannt: TRAIL- R3/DcR1, TRAIL-R3 /DcR2/TRUNDD und Osteoprotegrin. (68-70)

TRAIL- R3 und TRAIL-R4 haben keine funktionierende zytoplasmatische Domäne, d.h. sie leiten nach Ligandenbindung kein Signal ins Innere der Zelle weiter (71). Sie dienen als so genannte „Decoy- Rezeptoren“ und können so Zellen vor TRAIL induzierter Apoptose schützen.

Bisher bekannte physiologische Rolle von TRAIL (72):

- Tumorentwicklung und Metastasierung
- T- Zell vermittelte Zytotoxizität und Graft- versus Tumor- Effekt nach allogener Stammzelltransplantation
- Abtötung von Zielzellen durch NK-Zellen
- Regulierung der durch dendritische Zellen vermittelten Apoptose
- durch Monozyten vermittelte Anti- Tumor- Aktivität
- T- Zell- Tod bei HIV

1.7 Der Einsatz von TRAIL in der Onkologie

Es wurde schon häufig gezeigt, dass TRAIL in humanen Karzinomzelllinien, Apoptose induziert. TRAIL wirkt *in vitro* und *in vivo* sowohl alleine als auch in der Kombination mit Bestrahlung. TRAIL ist jedoch ein relativ schwieriges Agens, so ist es abhängig von der Präparation toxisch. Neben TRAIL wurden jetzt die agonistischen TRAIL- Antikörper eingeführt.

In der vorliegenden Arbeit, wurden die agonistischen TRAIL- Antikörper HGS- ETR1 und HGS-ETR2 eingesetzt. HGS-ETR1 (Maptumumab) weist eine hohe Affinität und Spezifität für TRAIL-R1/ TRAIL-DR4 auf. HGS-ETR2 aktiviert TRAIL-R2/TRAIL-DR5.

Im Vergleich zu TRAIL haben die agonistischen Antikörper folgende potentielle Vorteile:

Sie weisen gegenüber TRAIL eine verlängerte Halbwertszeit *in vivo* und damit ein größeres therapeutisches Potential auf (73).

Ein hohes Level an Decoy- Rezeptoren kann die Tumorzelle vor TRAIL schützen, die spezifischen Antikörper überwinden dieses Hindernis (74, 75)

Es liegen bereits erste Ergebnisse klinischer Phase 1- bzw. Phase 2 –Studien vor. Patienten mit einem Non- Hodgkin- Lymphom, die schon mehrfach vortherapiert waren, erreichten in 30% stable disease unter Monotherapie mit HGS- ETR1(76), Patienten mit kolorektalen Karzinomen erreichten in 31,6% unter der Monotherapie

stable disease (77) und Patienten mit nicht- kleinzelligem Bronchialkarzinomen in 29%(78).

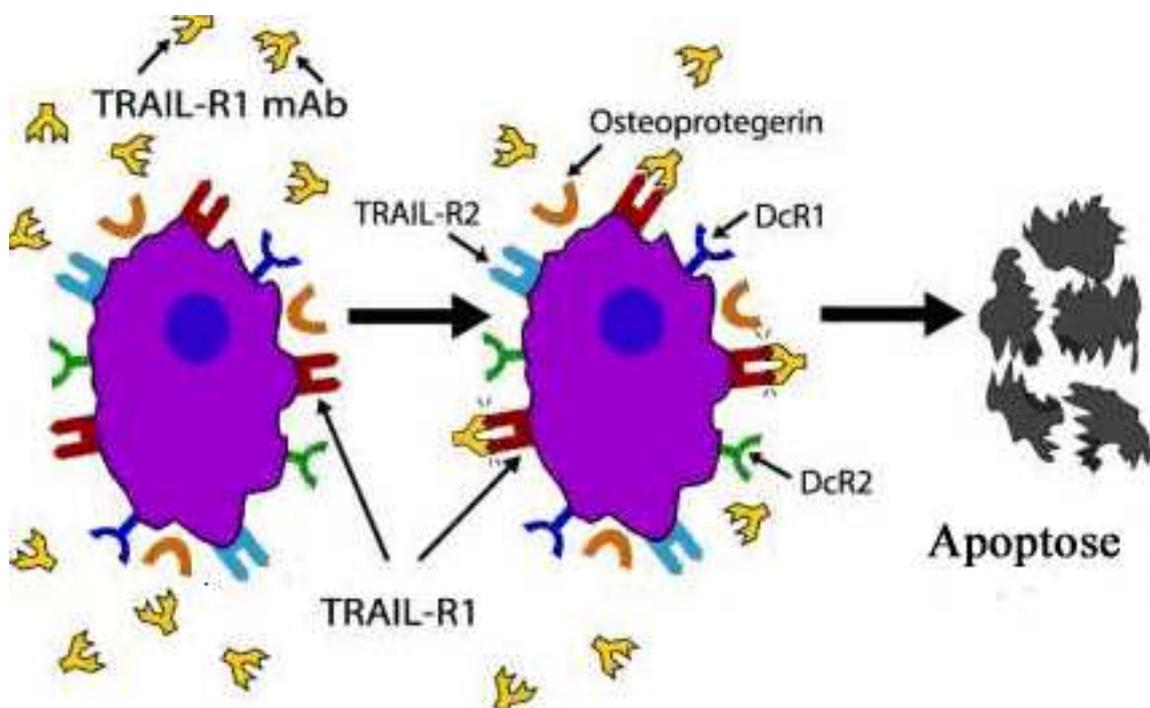


Abbildung 6:(modifiziert nach Human Genome Sciences Press Release) es wird dargestellt wie der monoklonale Antikörper HGS-ETR1 (TRAIL-R1mAb) selektiv an den TRAIL-R1 Rezeptor bindet

1.8 Themenstellung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es zwei getrennte Wege der Apoptoseinduktion gibt: der intrinsische oder auch mitochondriale Apoptoseweg, der durch eine Schädigung der DNA induziert wird. Auf diese Weise löst Bestrahlung Apoptose aus. Daneben gibt es noch den extrinsischen- rezeptorvermittelten Weg, bei dem die direkte Caspasenaktivierung am DISC im Vordergrund steht. Zwischen beiden bestehen Verbindungen einerseits direkt über Bid andererseits indirekt durch Rezeptorhochregulation. Die Idee der Kombination beider Apoptosemechanismen in der Tumorthherapie liegt also nahe. Für TRAIL wurde schon die Wirkung in der Kombinationstherapie gezeigt. So wurde nachgewiesen, dass Bestrahlung Brustkrebszellen, Leukämiezellen, Kolonkarzinomzellen und Gliomzellen gegenüber TRAIL induzierter Apoptose sensibilisiert (95,99). (Marini et al 2005, Belka et al 2001).

Nach Vorliegen der agonistischen Antikörper stellt sich die Frage, ob sich durch die Kombination von Antikörpergabe und Bestrahlung auch ein verstärkender Effekt ergibt, Resistenzen überwunden werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Kombinationswirkung der agonistischen TRAIL-Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 und Bestrahlung untersucht und die molekulare Basis entschlüsselt werden. Dazu wurden verschieden humane Tumorzelllinien verwendet: die kolorektalen Tumorzelllinien Colo 205, HCT 15, HCT116 wt und HCT116 k.o., die Bronchialkarzinomzelllinie NCI H460 und die Prostatakarzinomzelllinien Du 145 mock und Du 145 Bax

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth
Aproteine-Leupeptin	Sigma
APS	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
CCCP	Sigma
Deoxycholat	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
FCS	Gibco
Glycerin	Sigma
Glycin	Serva
HEPES	Sigma
Hoechst 33342	Calbiochem
KH_2PO_4	Merck
Kulturmedium RMPI	Gibco
Marker	Amersham
Methanol	Merck
NaCl	Merck
NaF	Merck
NaHPO_4	Merck
Napp-Sodiumpyrophosphat	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
SDS	Sigma
SDS-Puffer (10 fach)	Roth

β-Mercaptoethanol	Sigma
TEMED	Roth
TMRE	Mobitech
Tris	Merck
Trisbase	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton	Sigma
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Sigma

2.2 Puffer und Lösungen

Transferpuffer für Westernblot:

2,9 g Glycein
5,8 g Trisbase
0,37 g SDS
200 ml Methanol
ad 1000 ml dest. Wasser
pH 8,3

TBS

1, 57 g Tris-HCl
8,766 g NaCl
ad 1000 ml dest. Wasser
pH 8,0

AP-Puffer

15,7 g Tris-HCl
5,84 g NaCl
ad 1000 ml dest. Wasser
pH 9,5

Trennpuffer

18,17 g Trisbase

	4 ml 10% SDS ad 100 ml dest. Wasser pH 8,8
Sammelpuffer	6,06 g Trisbase 4 ml 10% SDS ad 100 ml dest. Wasser pH 6,8
Probenpuffer	2,0 ml Glycerin 2,0 ml 10% SDS 0,025 g Bromphenolblau 2,5 ml Sammelpuffer ad 9,5 ml dest. Wasser
Lysepuffer	25 mMol HEPES 0,1% SDS 0,5% Desoxycholat 1,0% Triton 10 mMol EDTA 10 mMol Napp-Sodumpyrophosphat 10 mMol NaF 125 mMol NaCl vor Gebrauch Zugabe von 20 µl/ml Aprotein-
Leupeptin	
TBS-Triton	TBS + 0,02% Triton
TBS-Tween	TBS + 0 05% Tween 20
Blocklösung/Blotto	TBS + 0,05% Tween 20 + 5 % FCS
PBS	8,0 g NaCl

0,2 g KCl
 1,15 g NaHPO₄
 0,2 g KH₂PO₄
 ad 1000 ml dest. Wasser
 pH 7,4

2.3 Verbrauchsmaterial

Filterpapier 3MM	Whatman
Kopierfolie	Xerox
Nitrozellulosemembran/ Blottingmembran	Hybond ECL, Amersham
Röntgenfilm	Hyperfilm, Amersham

2.4 Antikörper und Liganden

Primärantikörper für Westernblot:

- anti-Caspase-8, mouse
freundlicherweise erhalten von
K. Schulze-Osthoff
- anti-PARP, rabbit
Boehringer
- ant-Bax, rabbit
Cell signaling

Sekundärantikörper für Westernblot:

- anti-mouse IgG-AP
Biotechnology
SantaCruz
- anti-rabbit IgG-AP
Biotechnology
SantaCruz

Liganden:

Die agonistischen TRAIL-Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 wurden uns freundlicherweise von Human Genome Sciences, Rockville, MD, USA zur Verfügung gestellt.

2.5 Zelllinien

- Die humane Tumorzelllinie Colo 205 wurde bei ATCC (Bethesda, MD, USA) gekauft (ATCC-Nummer: CCL-222).
- Die humane Tumorzelllinie HCT 15 wurde bei der DSMZ in Braunschweig gekauft (DSMZ-Nummer: ACC 357).
- Die humanen Tumorzelllinien HCT 116 Bax wt (d.h. Bax positiv) und HCT 116 Bax knockout (k.o.), d.h. Bax negativ erhielten wir freundlicherweise von B. Vogelstein (John Hopkins University, MD, USA).
- Die humane Tumorzelllinie NCI H 460 wurde bei ATCC (Bethesda, MD, USA) gekauft (ATCC-Nummer: HTB-177).
- Die humanen Tumorzelllinien Du 145 mock (Bax Nullsystem) und Du 145 Bax (Bax retransfiziert) erhielten wir freundlicherweise von Peter Daniel (Charité, Berlin).

2.6 Geräte

Brutschrank	Heraus Instruments
Bestrahlungsgerät	LINAC SL25, Phillips
Elektrophoresekammer	Biometra
Filmentwickler	Sterling,
Fluoreszenzmikroskop	Fluovort, Wild Leitz
Laborzentrifuge	Hettich
Mikroskop	Wilovort, Wild Leitz
Schüttler	Biometra
Semi-dry-Blot	HoferScientific Instruments
Sterilbank	Heraus Instruments
Tankblot	BioRad
Tischzentrifuge	Eppendorf

3 Methoden

3.1 Zellkulturen

Die Experimente werden mit den humanen Tumorzelllinien Colo 205, HCT 116 Bax wildtyp, HCT 116 Bax negativ, HCT 15, Du 145 mock, Du 145 Bax und NCI H460 durchgeführt. Die Zellen werden als adhärenente Kulturen mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ bei 37°C , 5% CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Kulturmedium dient RPMI mit dem Zusatz von 10% foetalem Kälberserum (FCS) und als Antibiotika 100 U/ml Penicillin und $100\mu\text{g/ml}$ Streptomycin.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Erhaltungskulturen der Zellen werden bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Einfrieren der Zellen erfolgt folgendermaßen:

$1-5 \times 10^6$ Zellen werden abzentrifugiert und in 10 ml Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium besteht aus 80% RPMI- Medium, 10 % FCS und 10 % DMSO. Das Einfrieren erfolgt, indem die Zellen in den Cryoröhrchen zunächst für 12- 24h in einer mit Isopropanol gefüllten Box bei -80°C gelagert werden, um anschließend in den Stickstofftank überführt zu werden. Aufgetaut werden die Zellen zunächst im 37°C warmen Wasserbad, anschließend einmal mit Medium gewaschen und anschließend mit frischem Medium in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2 Nachweis von Proteinen

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl und Herstellung der Zellysate

Der Zellüberstand wird zusammen mit dem bei der Waschung mit PBS anfallenden Überstand und den abtrypsinierten Zellen zentrifugiert.

Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert.

Eine kleine Probe von ca. 10µl wird für die Zellzählung verwendet.

Die Probe wird 1:1 mit Trypanblaulösung (Vitalitätsbestimmung) verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer- Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt .Dann werden die Zellen in einem Puffer bestehend aus 1/3 CST (3fach) und 2/3 PBS aufgenommen, dabei kommen auf 1×10^6 Zellen 100µl Puffer. Anschließend werden die Proben für 10 min bei 99 °C in einem Heizblock erhitzt (zur Denaturierung der DNA) und dann bei -20°C eingefroren

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wandern aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld. Nettoladung, Größe und Gestalt der Proteine bestimmen ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Mit einer SDS- Page werden die Proteine nach Molekülmasse aufgetrennt. Ein Polyacrylamidgel dient als Träger der Proteine. Das in den Polyacrylamidgelen enthaltenen SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Bezirke des Proteins und lädt es zum einen dadurch negativ und hebt die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auf. Kleine Proteine können schneller durch die Poren des Gels wandern und sind schließlich der Anode am nächsten.

Man hat ein Trenngel auf das noch eine kleine Schicht Sammelgel mit niedriger Acrylamidkonzentration gegossen wird. Dieses Gel durchlaufen alle Proteine sehr schnell und sammeln sich dann am Übergang vom Sammel- zum Trenngel. Die gesamte Elektrophorese findet in einem Laufpuffer statt. Die Auftrennung erfolgt im Sammelgel bei 60 mA und im Trenngel bei 160 mA

Tabelle 1: Zusammensetzung der Gele

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	12% ig	14% ig	
Wasser	5,25 ml	4,25 ml	3.00 ml
Trennpuffer	3,75 ml	3,75 ml	%
Sammelpuffer	%	%	1,25 ml
Gel 30	6,00 ml	7,00 ml	0.75 ml
APS 10%	75 µl	75 µl	50 µl
Temed	7.5 µl	7,5 µl	5 µl
20% SDS	75 µl	75 µl	%

3.2.3 Westernblot

Nach der Elektrophorese erfolgt ein Abklatsch („*blot*“) der Proteine auf Nitrozellulosepapier.

Dieses Papier kann dann später mit spezifischen Antikörpern getränkt werden und die Proteine identifiziert werden. Die Proteine werden in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer bei 80V für ca. 60 min vom Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend müssen die proteinfreien Stellen der Membran besetzt werden, dies erfolgt indem die Membran für 60 min in einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBS- Tween geblockt wird. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht. Anschließend wird die Membran mehrmals mit TBS-Tween gewaschen, um unspezifische gebundene Antikörper zu entfernen. Dann folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Der Sekundärantikörper ist an das

Markerenzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Daraufhin wird die Membran wieder mit TBS- Tween gewaschen. Jetzt wird das Substrat des Markerenzym hinzu gegeben. Die Detektion der Lichtreaktion erfolgte mit dem käuflichen ECL-Substrat nach Herstelleranleitung.

3.3 Messung von Zelltod

3.3.1 Hoechst-Färbung

Der Farbstoff Hoechst 33342 interkaliert mit der Zell- DNA und erlaubt dem Betrachter anhand der Morphologie zwischen gesunden und apoptotischen Zellen (klassisches Sternhimmelbild stark leuchtender unterschiedlich großer Punkte) und gesunden Zellen (homogenes Bild mäßig leuchtender Punkte) zu unterscheiden .Die sichere Diskrimination zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte durch die Zugabe von Propidiumjodid, welches nekrotische Zellen rot anfärbt. Der Farbstoff wird in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ zu den Zellen hinzu gegeben, dann folgt eine Inkubation von 15 min bei 37°C . Unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Filter von 380nm werden dann die Zellen ausgezählt und der Anteil an gesunden, nekrotischen und apoptotischen Zellen bestimmt

3.4 Koloniebildungstest

Der Erfolg einer Tumortherapie hängt in großem Maße auch davon ab, ob sie Tumorzellklone zurücklässt, die weiter proliferieren oder nicht. In vitro wird dies mithilfe der so genannten Koloniebildungstests geprüft. Dazu werden die Zellen in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ pro 10 ml Medium in Flaschen ausgesät. Danach

werden die Zellen mit verschiedenen Dosen (2, 4,6 und 8 Gy) bestrahlt und/ oder mit TRAIL- Antikörpern behandelt. 24 h später werden die Zellen dann abtrypsiniert, in neuem Medium aufgenommen und in unterschiedlichen Zell-Konzentrationen in 6-well- Platten ausplattiert. Nach ca. 7 Tagen wird der Versuch dann abgestoppt, d.h. das Zellmedium wird entfernt, die Zellen mit Formalin fixiert und mit Comassie- Blau angefärbt. Jetzt kann die Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt werden. Die Auswertung der Koloniebildungstests erfolgt folgendermaßen:

Für jeden Behandlungsmodus ergibt der Mittelwert der gewachsenen Kolonien durch die ausgesäte Zellzahl die „*plating efficiency*“.

Im Diagramm wird die „*surviving fraction*“ dargestellt. Um die „*surviving fraction*“ zu bestimmen wird der unbehandelten Kontrolle eine „*surviving fraction*“ von 1 zugeordnet und die anderen Werte dann auf die Kontrolle normiert.

4 Ergebnisse

4.1 Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung oder HGS-ETR1 bzw. HGS-ETR2

In einem ersten Versuchsansatz wurde das Ansprechen von Tumorzellen auf Bestrahlung untersucht. Dazu wurden die humanen Karzinomzelllinien Colo 205, HCT 15, HCT 116wt und HCT 116 Bax knockout (k.o.), Du 145 mock, Du 145 Bax und NCI H 460 verwendet.

Die Zellen wurden mit 2, 4, 8 und 10 Gy bestrahlt. Der Farbstoff Hoechst 33342 ermöglicht die Differenzierung von apoptotischen (hell leuchtend- segmentierten) und nekrotischen (hell leuchtend nicht segmentierten) Zellkernen. Die Apoptoserate wurde nach Anfärbung der Zellen mittels des Hoechst- Apoptosefarbstoffes durch Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal wiederholt, die Mittelwerte sowie Standardabweichungen ermittelt.

Zu den Ergebnissen der Zelllinie HCT 116 k.o. werden keine Grafiken gezeigt, da die Apoptoserate bei allen Behandlungsmodalitäten unter 1% lag.

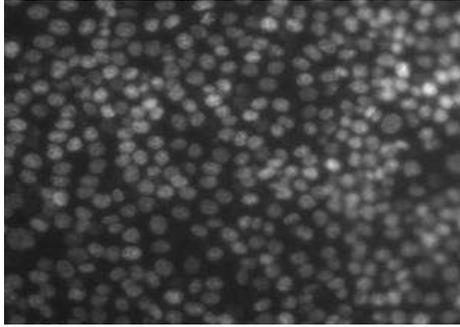


Abbildung 7: unbehandelte Colo 205- Zellen, nach 24h, Hoechst 33342 gefärbt, 400fach vergrößert, durch das Fluoreszenzmikroskop betrachtet

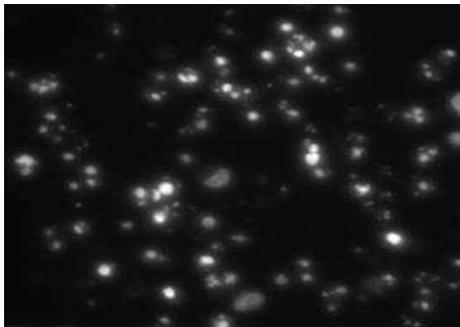


Abbildung 8: Typisches Sternenhimmelbild apoptotischer Colo 205- Zellen 24h nach Behandlung mit HGS-ETR 2 1,0 µg/ml+10 Gy, 400fach vergrößert, durch das Fluoreszenzmikroskop betrachtet

In den Abbildungen 9-14 ist die dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch Bestrahlung dargestellt. Bei der Zelllinie Colo 205 bewirkt die Bestrahlung mit 10 Gy eine Apoptoserate von 50 %, bei der Zelllinie NCI H460 sind es bei gleicher Dosis und Zeitspanne 25 %, bei der Zelllinie HCT 15 knapp 10 % , bei den Zelllinien Du 145 mock und Du 145 Bax knapp 5 % und bei der Zelllinie HCT 116 wt unter 1%.

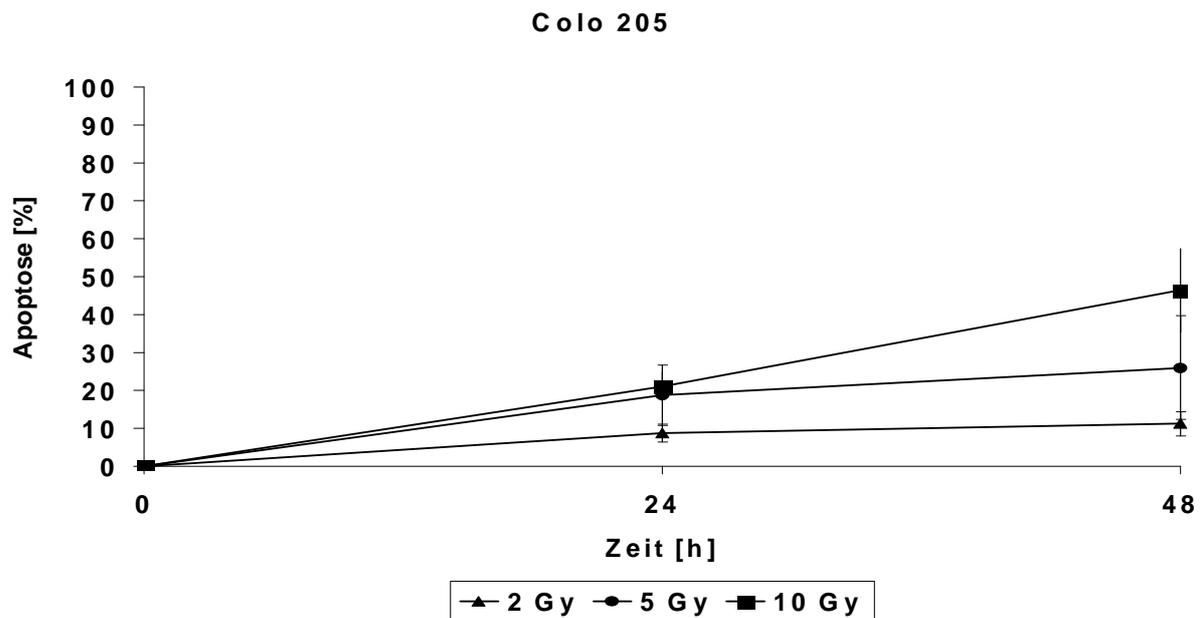


Abbildung 9: Apoptoseinduktion in Colo 205 24h und 48h nach Bestrahlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikrosko

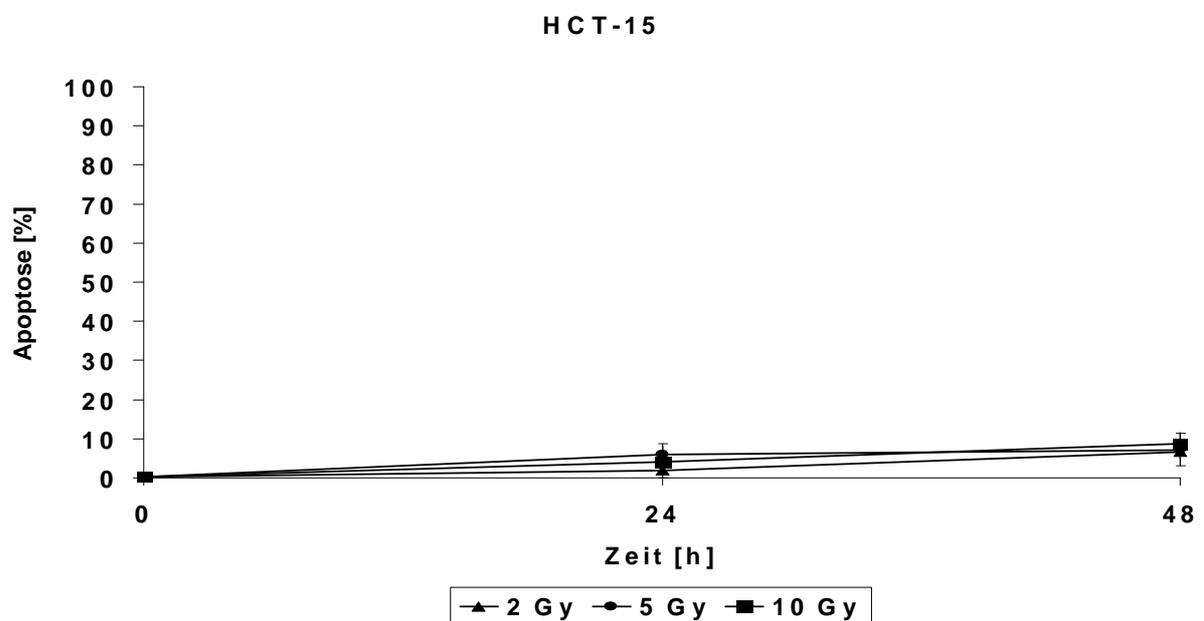


Abbildung 10: Apoptoseinduktion in HCT 15 24h und 48h nach Bestrahlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

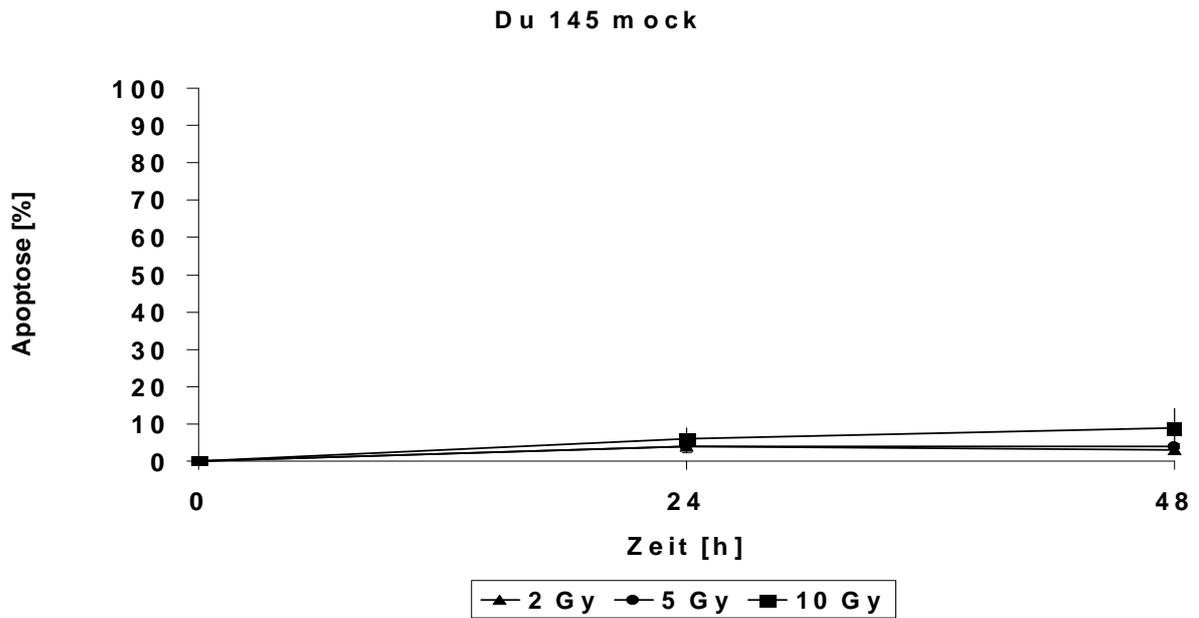


Abbildung11: Apoptoseinduktion in Du 145 mock 24h und 48h nach Bestrahlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

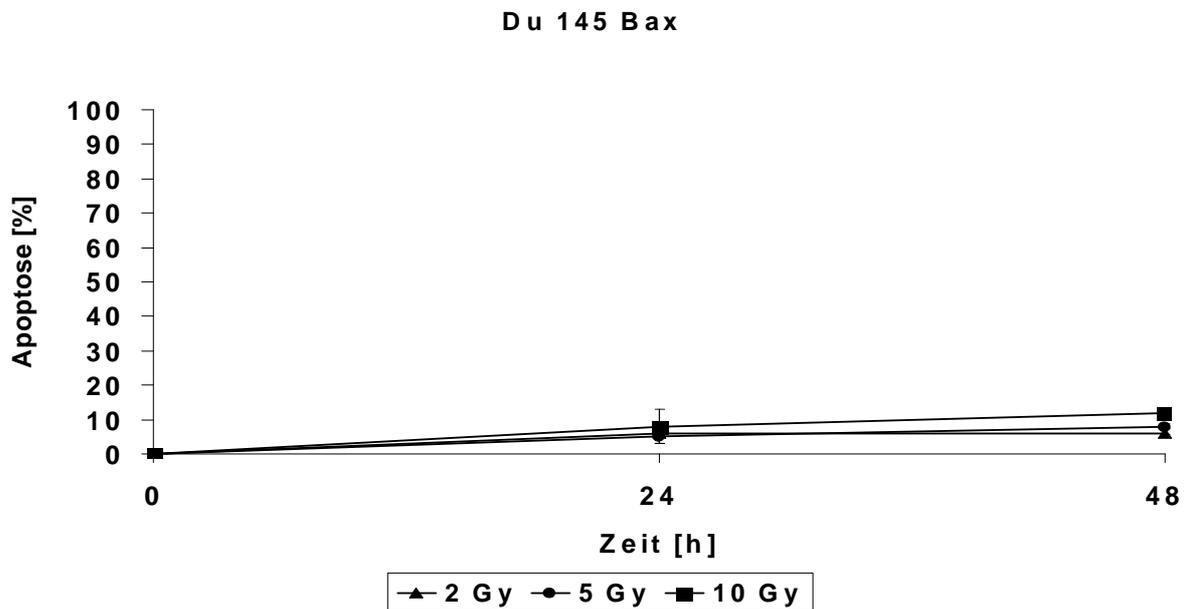


Abbildung12: Apoptoseinduktion in Du 145 Bax 24h und 48h nach Bestrahlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

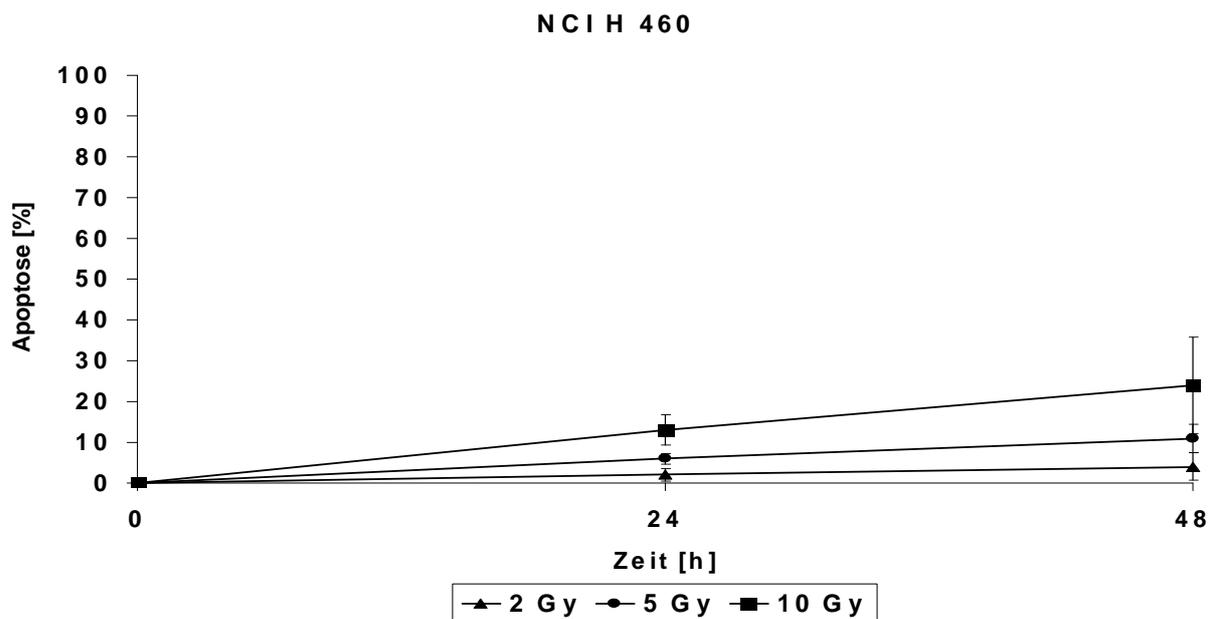


Abbildung13: Apoptoseinduktion in NCI H 460 24h und 48h nach Bestrahlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

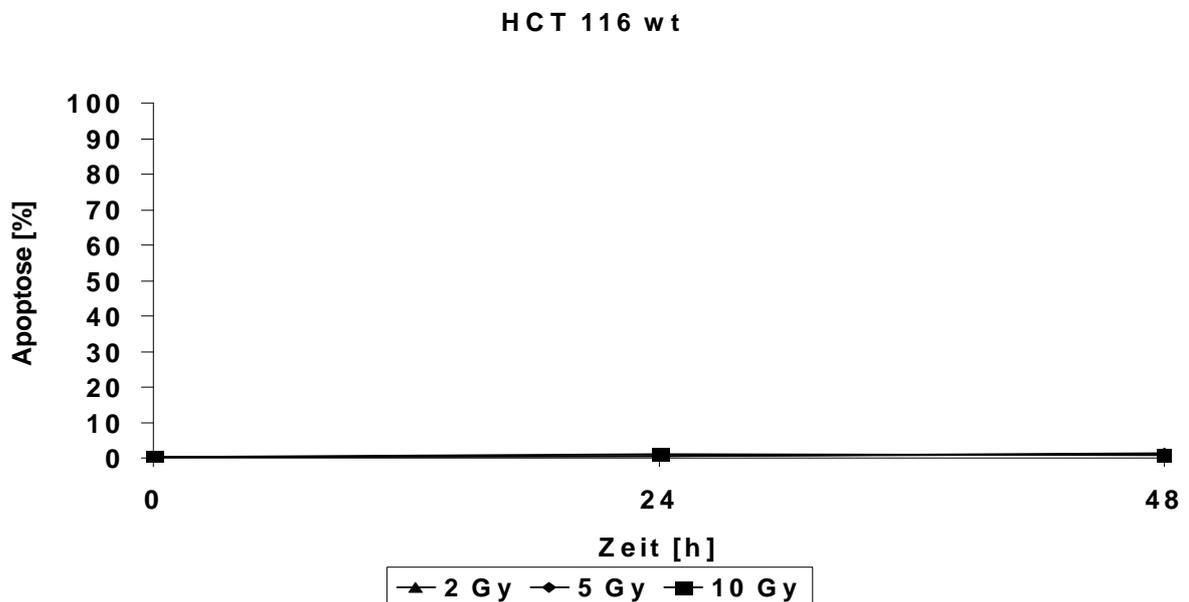


Abbildung14: Apoptoseinduktion in HCT 116 wt 24h und 48h nach Bestrahlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

4.1.1 Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1

Die Abbildungen 15-20 zeigen die zeit- und dosisabhängige Apoptoseinduktion durch den agonistischen TRAIL- Antikörper HGS-ETR1. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers stimuliert, nach 24 und 48 Stunden wurde die Apoptoserate gemessen. Die Zelllinie Colo 205 weist eine Apoptoserate von 45% nach 48h bei der höchsten Antikörperkonzentration von 1,0 mg/dl auf, nach der gleichen Zeitspanne und bei gleicher Antikörperkonzentration weist die Zelllinie HCT 15 eine Apoptoserate von knapp 40% auf, die Zelllinie HCT 116 wt knapp 20%, die Zelllinie Du 145mock 5%, die Zelllinie Du 145 Bax 15% und die Zelllinie NCI H 460 knapp 35%. Auffällig ist, dass die Zelllinien Colo 205 und NCI H 460 nach 24h eine höhere Apoptoserate als nach 48h aufweisen (55% bzw. 50%), eine möglich Erklärung, die auch mit dem Bild, das man unter dem Fluoreszenzmikroskop gewinnt, übereinstimmt, ist, dass ein Teil der apoptotischen Zellen nach 48h möglicherweise schon vollkommen abgestorben ist, so dass sie nicht mehr zählbar sind.

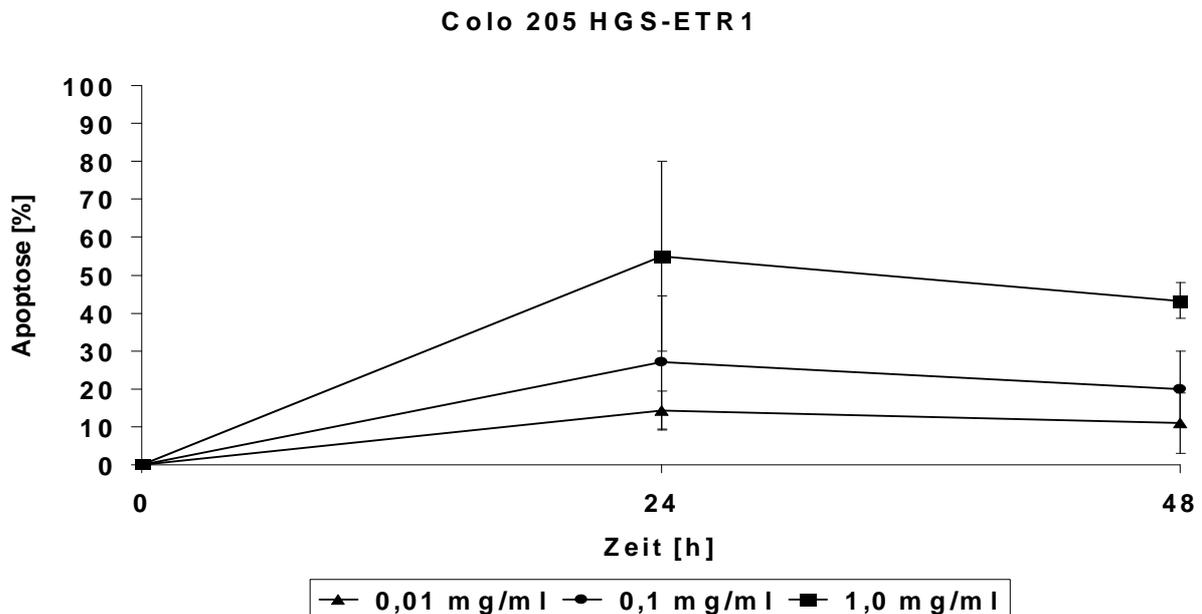


Abbildung 15: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR 1 in Colo 205 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

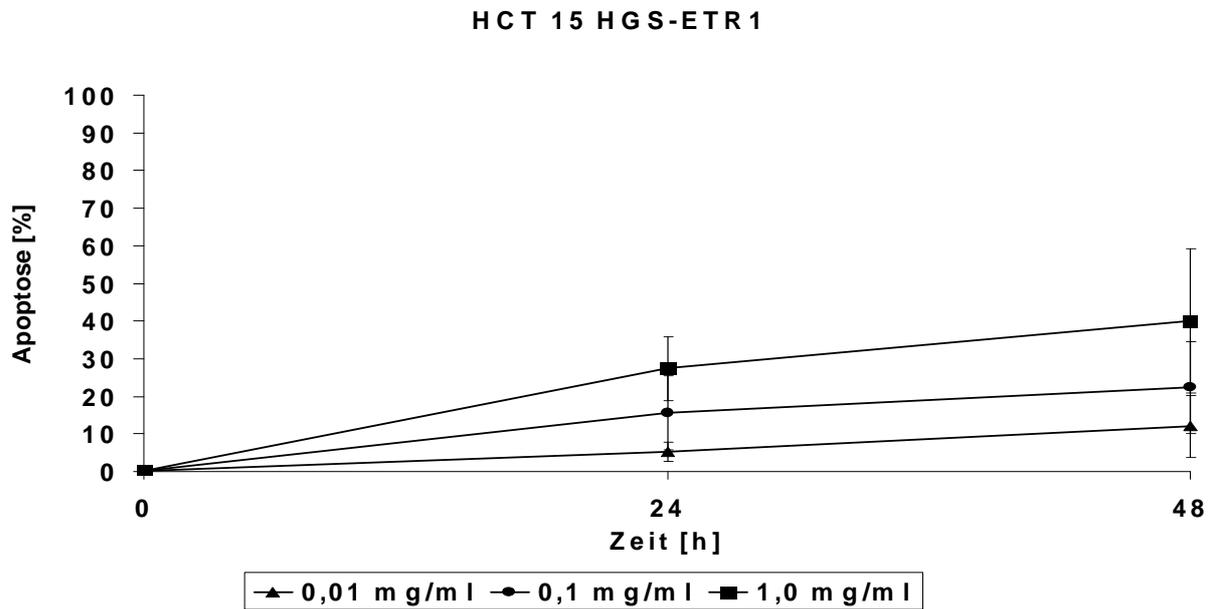


Abbildung16: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 in HCT 15, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

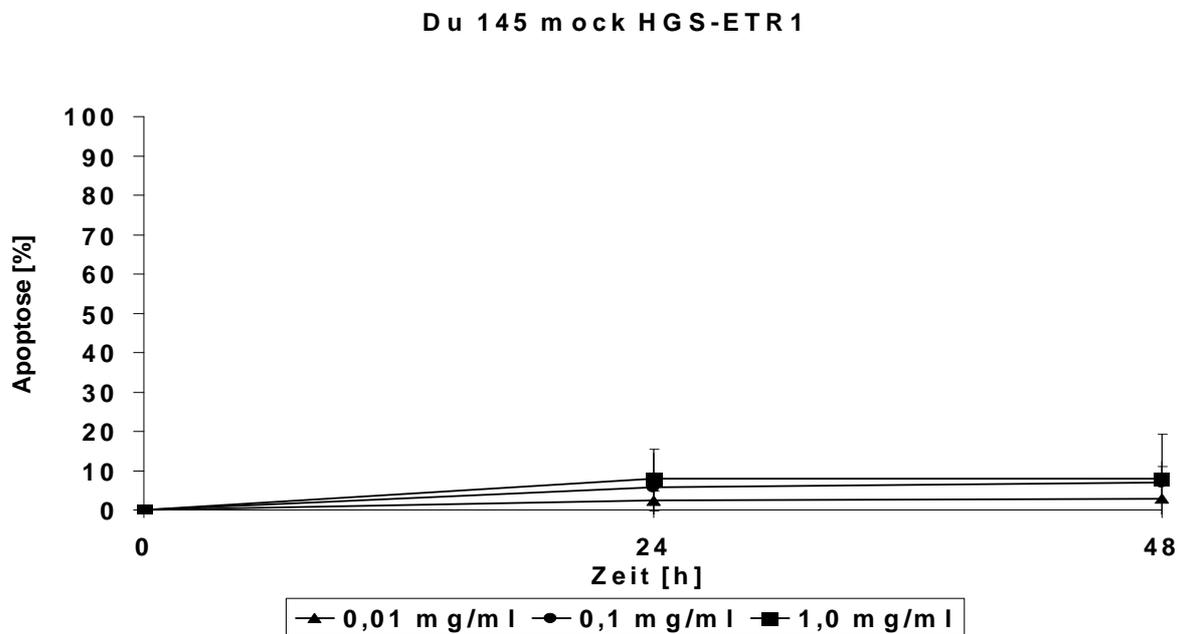


Abbildung17: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 in Du 145 mock, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

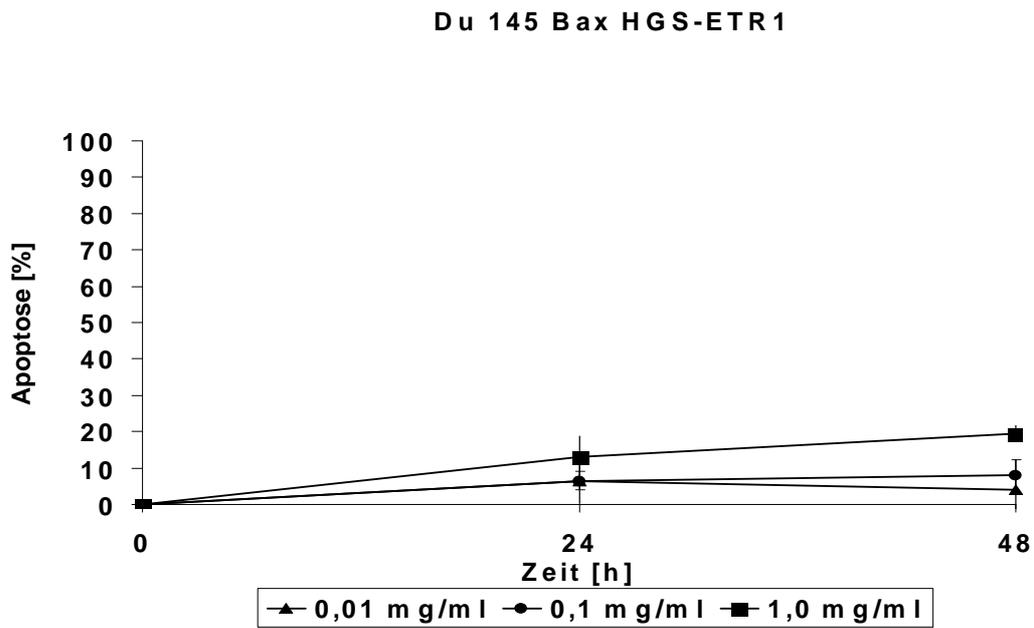


Abbildung 18: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 in Du 145 Bax, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

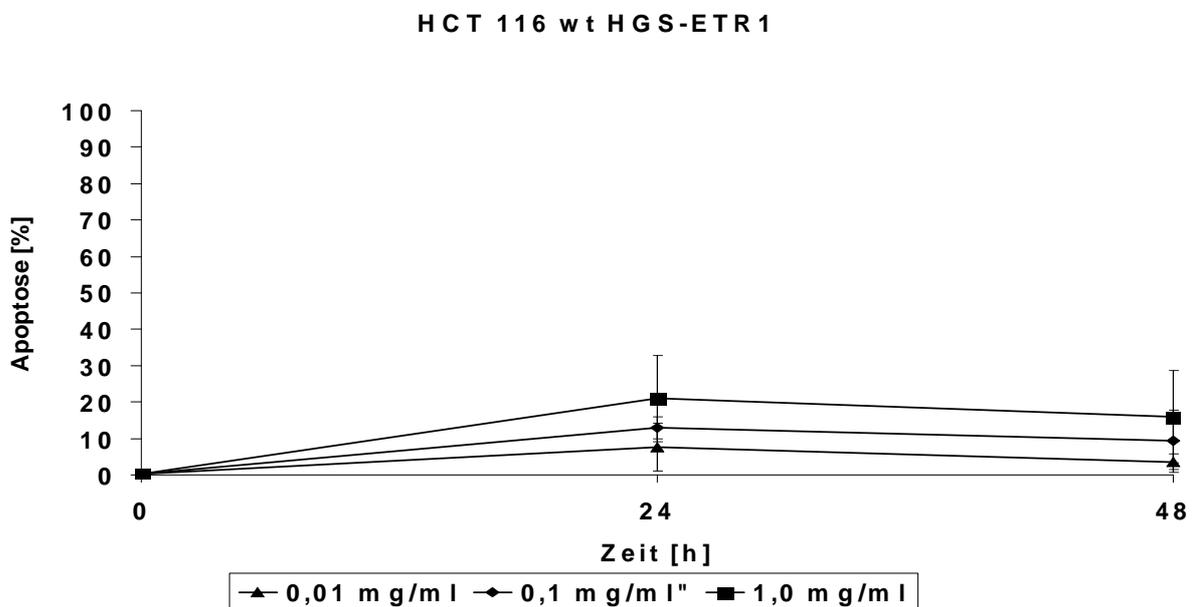


Abbildung 19: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 in HCT 116 wt, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

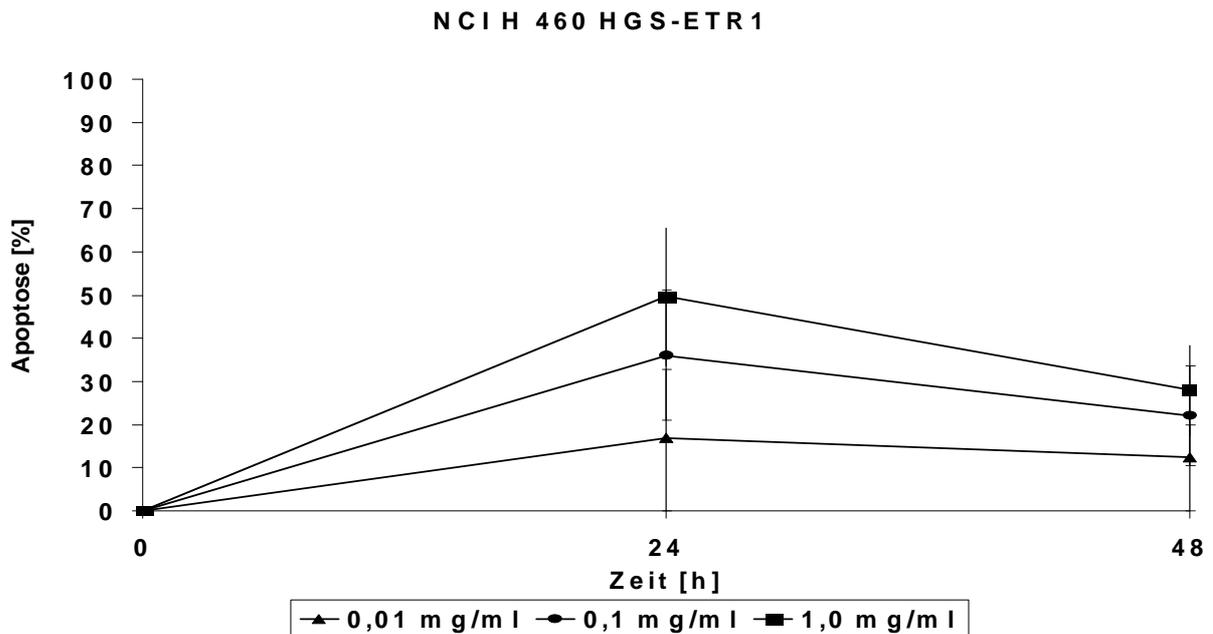


Abbildung 20: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 in NCI- H 460, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

4.1.2 Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2

Die Abbildungen 21-26 zeigen die Apoptoseinduktion durch den agonistischen TRAIL- Antikörper HGS- ETR2 in verschiedenen Konzentrationen nach 24 und 48 Stunden. So erreicht HGS-ETR2 nach 48h und bei höchster Konzentration (1,0mg/dl) bei der Zelllinie Colo 205 eine Apoptoserate von knapp 80%, bei HCT 15 15 %, bei HCT 116 wt 25%, bei Du 145 mock knapp 10%, bei Du 145 bax knapp 15 % und bei NCI H 460 30 %.

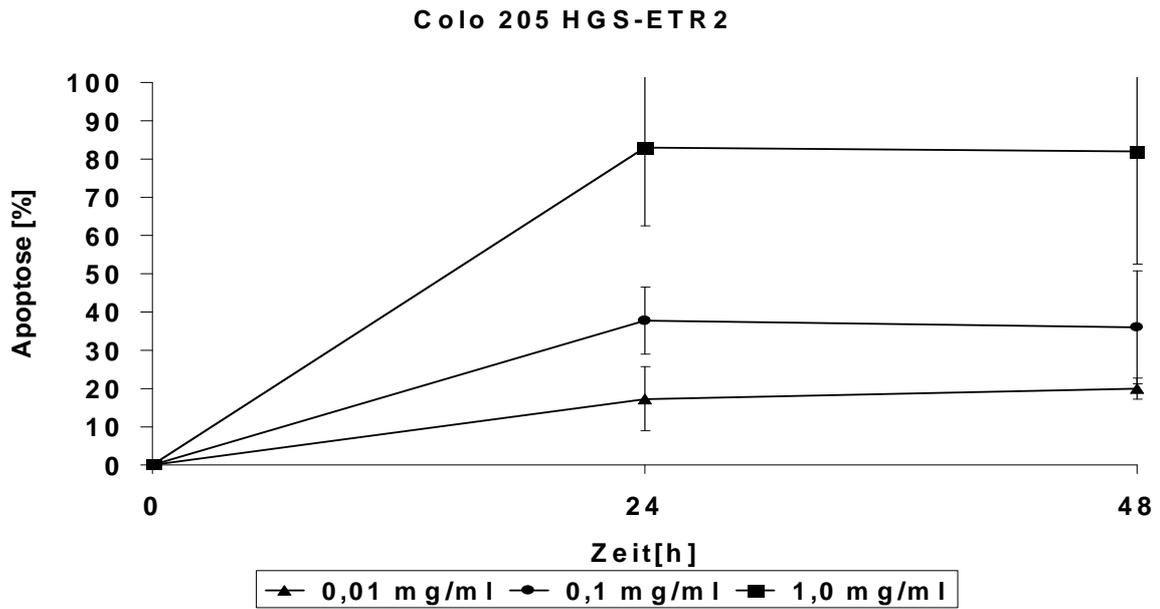


Abbildung 21: Apoptoseinduktion durch HGS- ETR2 in Colo 205, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

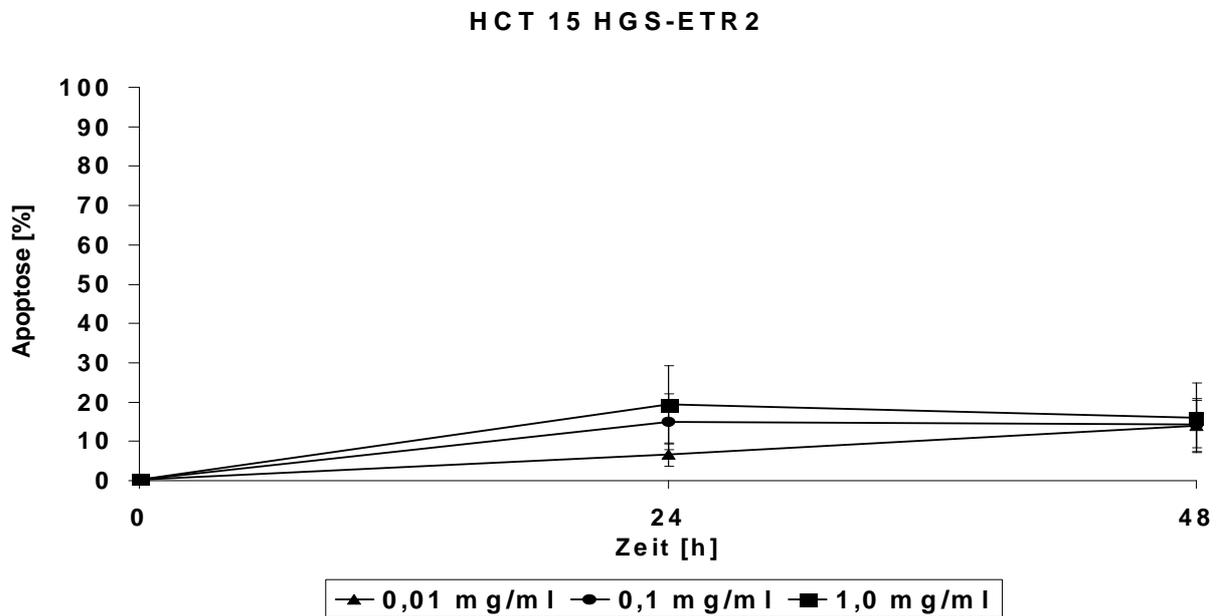


Abbildung 22: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2 in HCT 15, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

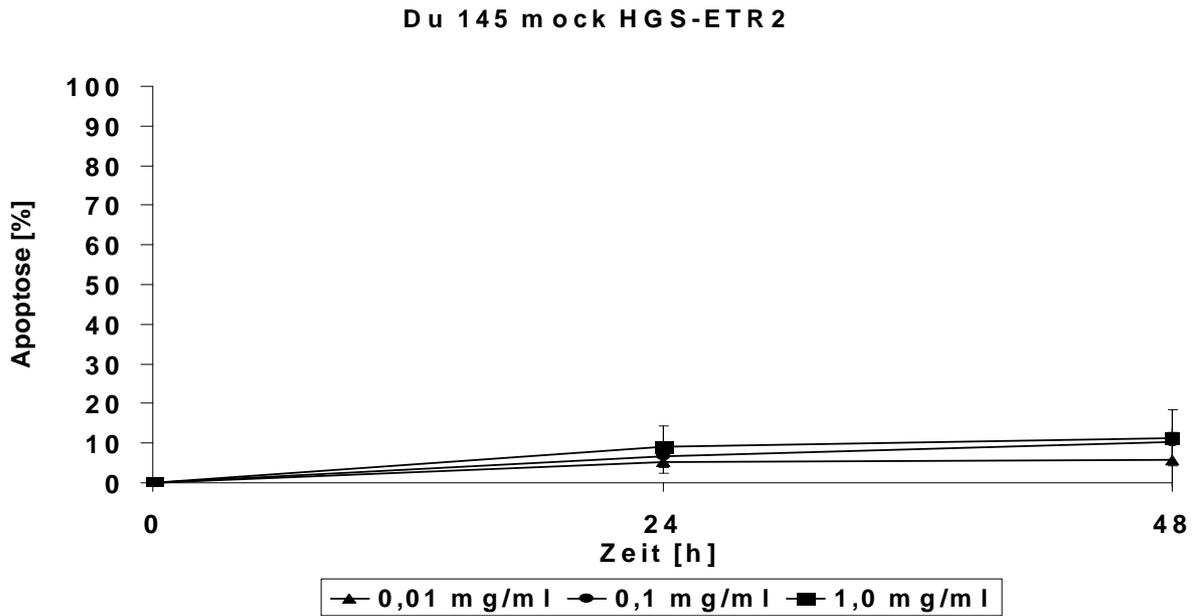


Abbildung 23: Apoptoseinduktion durch HGS- ETR2 in Du 145 mock, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

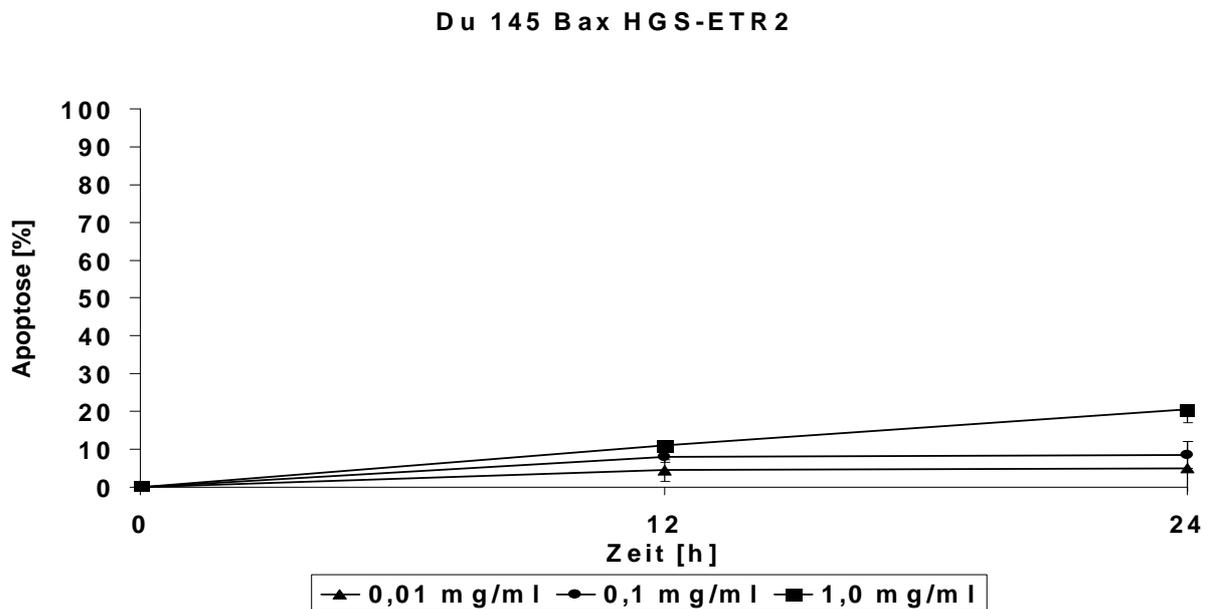


Abbildung 24: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2 in Du 145 Bax, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

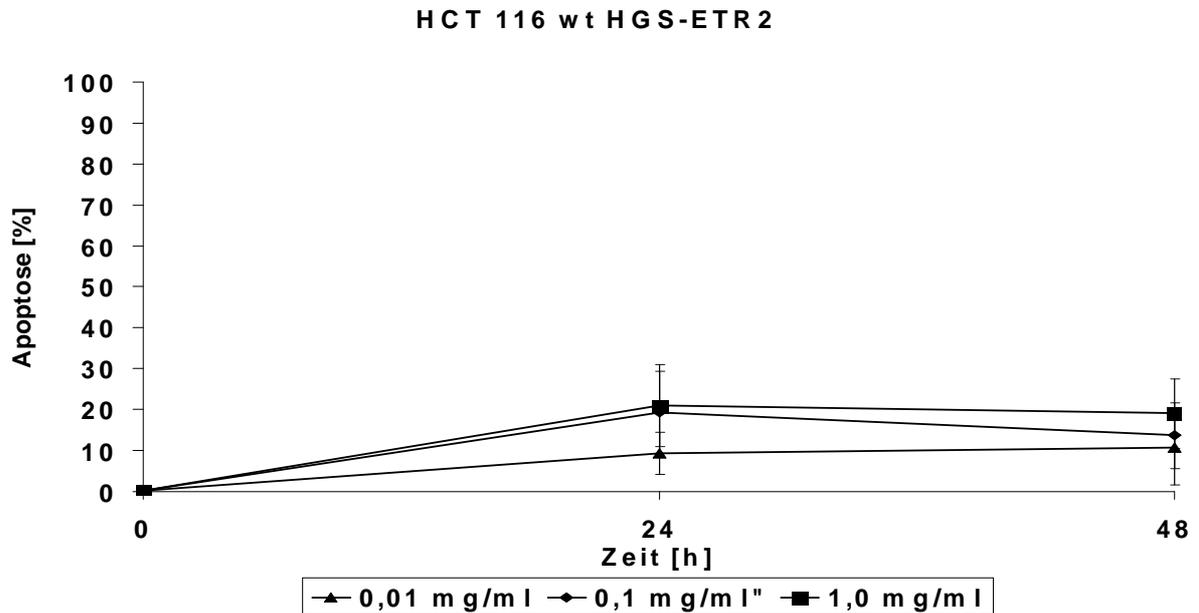


Abbildung 25: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2 in HCT 116 wt, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

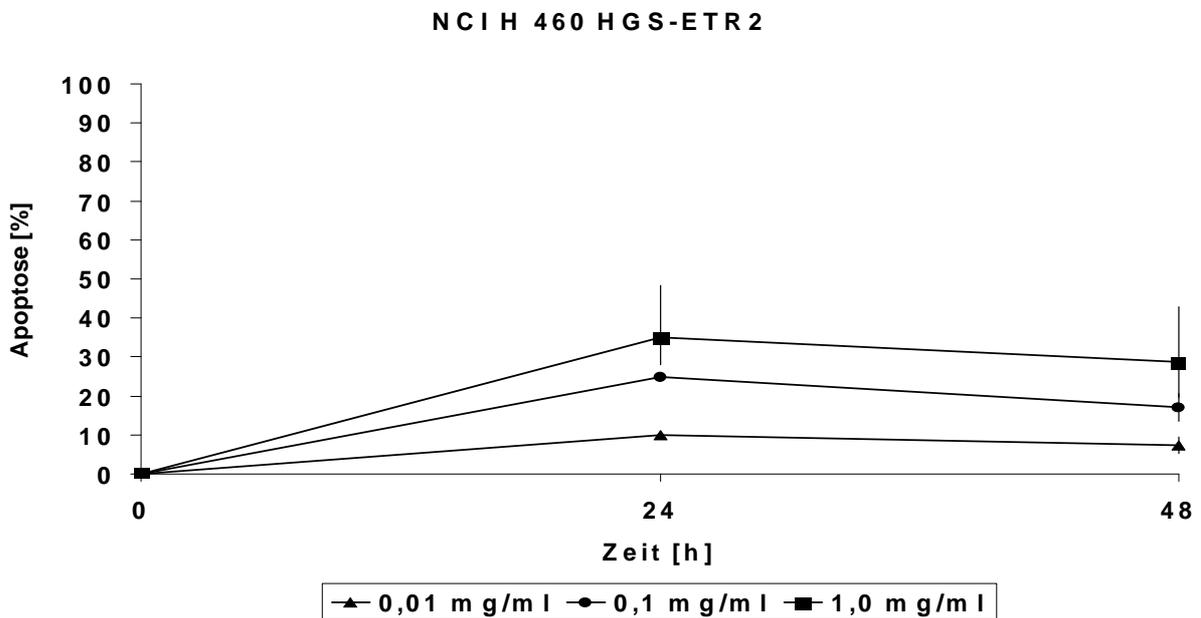


Abbildung 26: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2 in NCI H 460, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

4.1.3 Apoptoseinduktion durch Kombination der beiden Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2

Im Folgenden wurde nun die Wirkung der gleichzeitigen Gabe beider Antikörper untersucht.

Die Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 wurden gleichzeitig in verschiedenen Konzentrationen den Tumorzellen zugegeben. Nach 48h wurde die Apoptoserate bestimmt. Die Zelllinie Colo 205 weist dabei nach 48h bei höchster Konzentration beider Antikörper eine Apoptoserate von 92% auf, bei der Zelllinie HCT 15 findet sich eine Apoptoserate von 55%, bei HCT 116 wt 28%, bei Du 145 mock 20%, bei Du 145 bax 35% und bei NCI H 460 bei 45%.

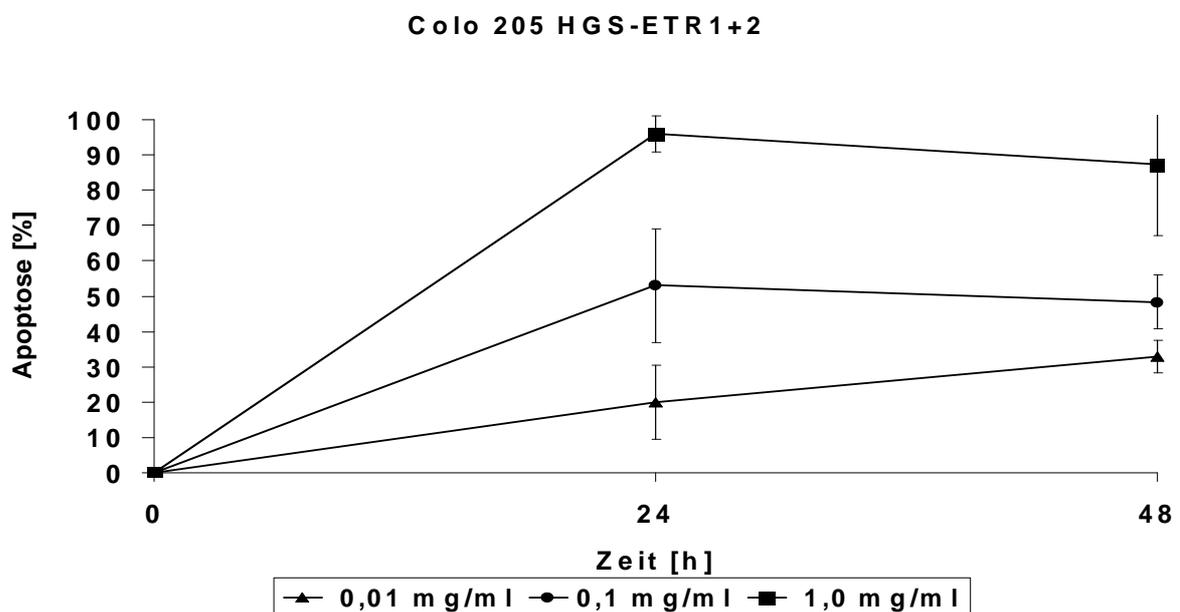


Abbildung 27: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2 in Colo 205, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

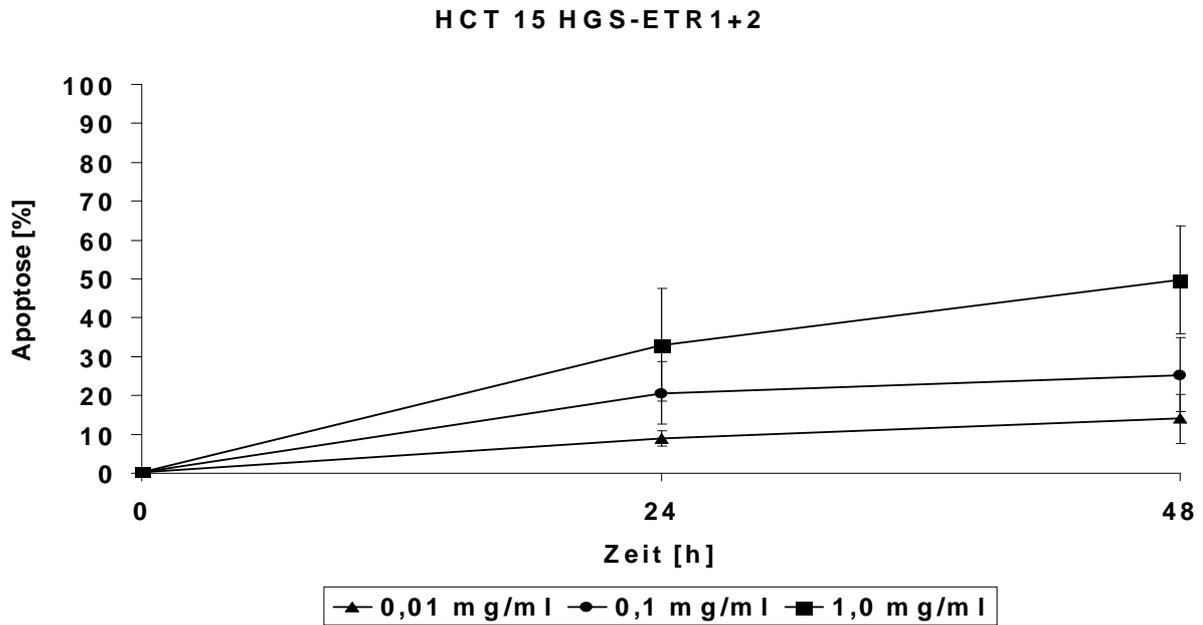


Abbildung 28: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2 in HCT 15, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

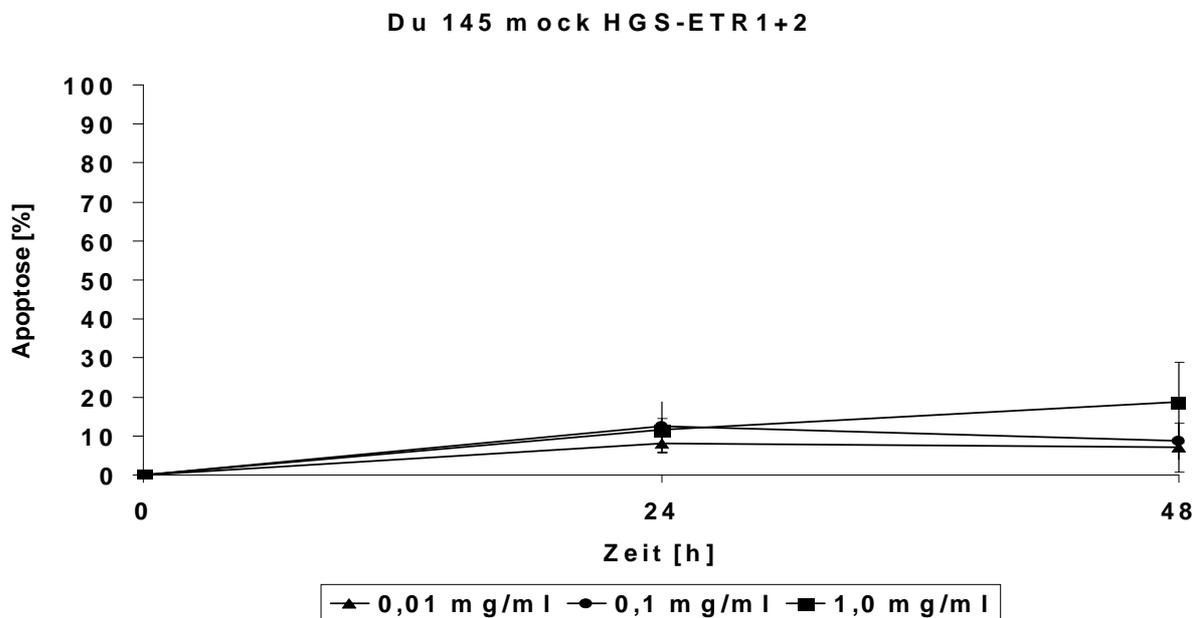


Abbildung 29: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2 in Du 145 mock, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

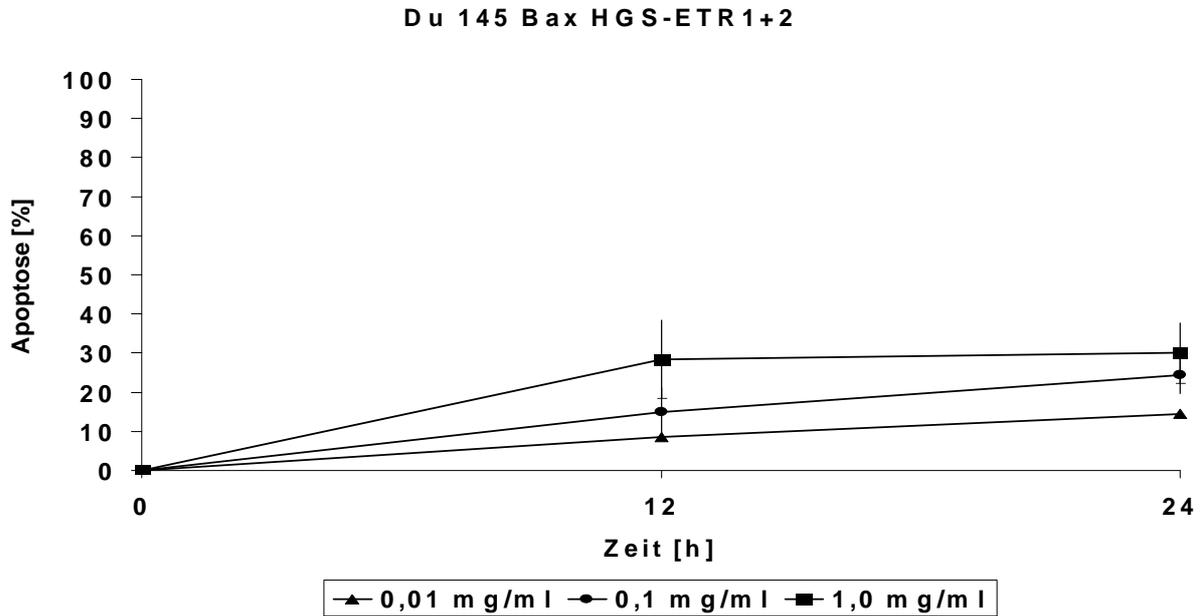


Abbildung 30: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2 in Du 145 Bax, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

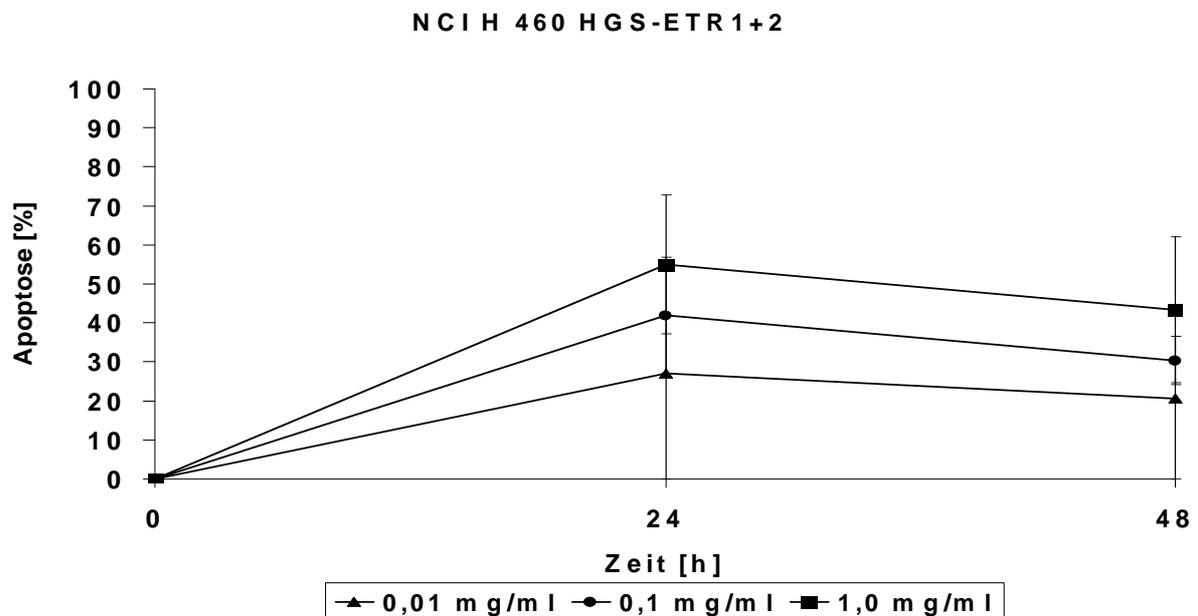


Abbildung 31: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2 in NCI H 460, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

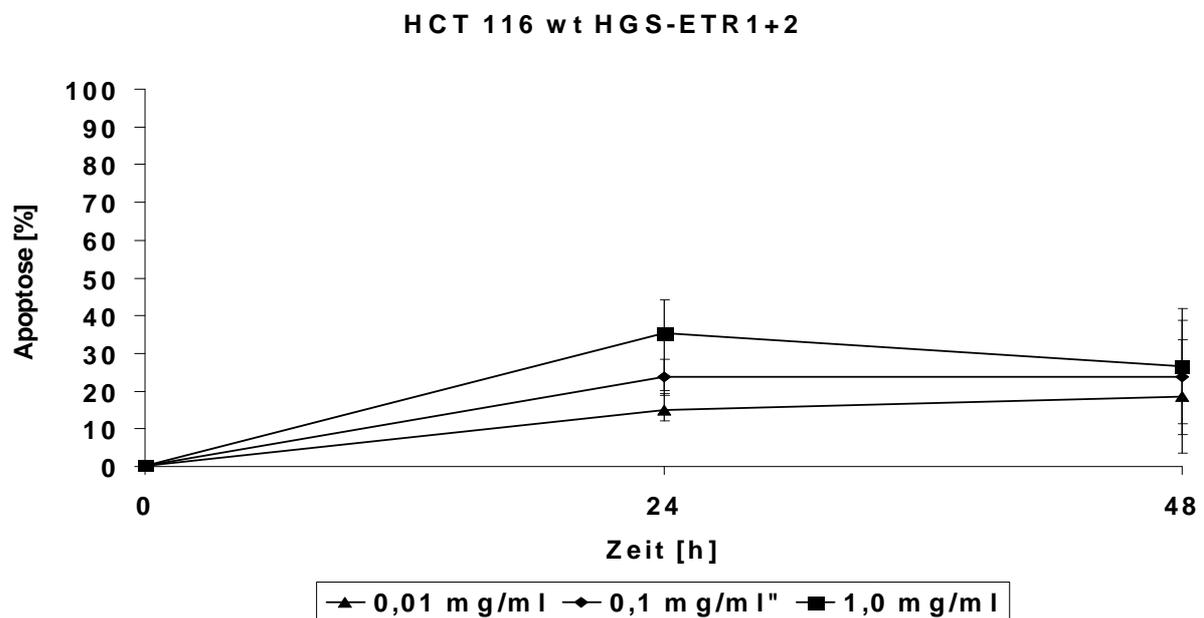


Abbildung 32: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2 in HCT 116wt24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die Heterogenität der einzelnen Zelllinien ist klar zu erkennen – sowohl, was die absolute Bereitschaft unter Therapie in Apoptose zu gehen anbelangt, als auch im Hinblick auf das Ansprechen auf die verschiedenen Antikörper.

HGS-ETR2 bewirkt in Colo 205 eine deutlich höhere Apoptoserate als HGS-ETR1 (knapp 80% vs 45%), während bei den HCT 15 HGS-ETR1 35% Apoptose nach 48h auslöst, HGS-ETR2 hingegen nur 15%. Bei den anderen Zelllinien ist kein deutlicher Unterschied, was die Apoptoseinduktion anbelangt, nachweisbar.

Mit Ausnahme der Zelllinie HCT 116 wt lässt sich durch die gleichzeitige Gabe beider Antikörper die Apoptoserate deutlich steigern.

4.2 Kombination von Antikörpergabe und Bestrahlung

Die einzelnen Zelllinien wurden simultan mit den Antikörpern in den Dosierungen 0,01, 0,1 und 1,0 mg/ml und in Dosen von 2, 5 und 10 Gy bestrahlt. Dargestellt sind hier nur die Diagramme der Kombinationstherapie mit einer Strahlendosis von 10 Gy und einer Antikörperkonzentration von 0,1mg/ml bei den Zelllinien Colo 205, HCT 15, NCI H 460 und HCT 116 wt und 1,0mg/m bei den Zelllinien Du 145 mock und Du 145 Bax.

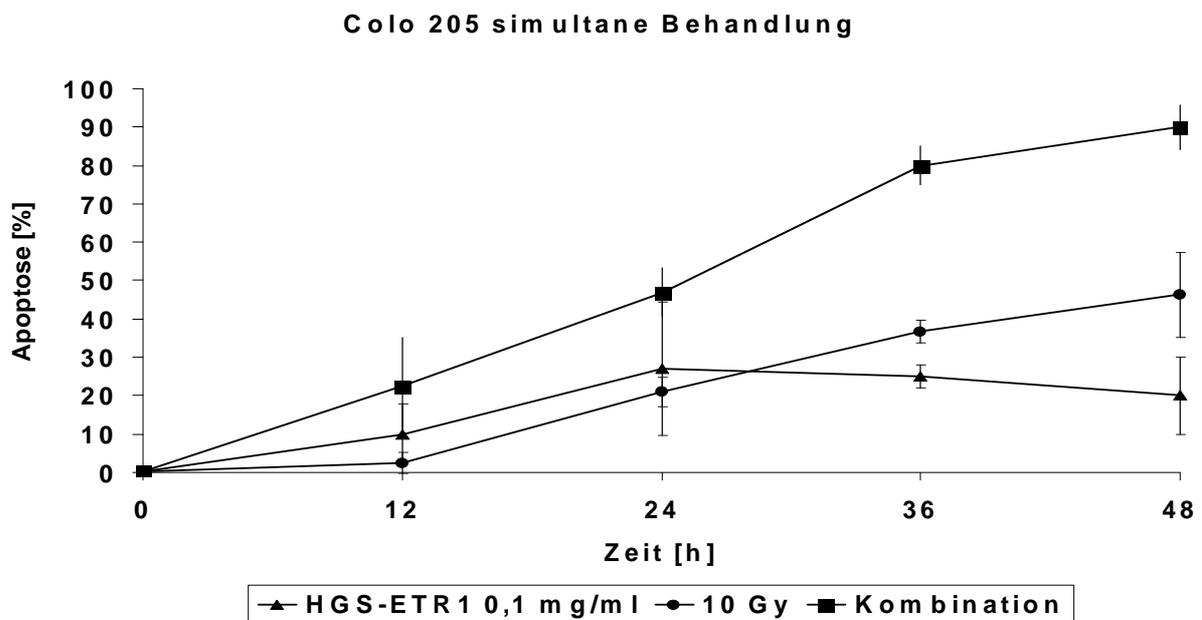


Abbildung 33: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+ 10 Gy in Colo 205, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

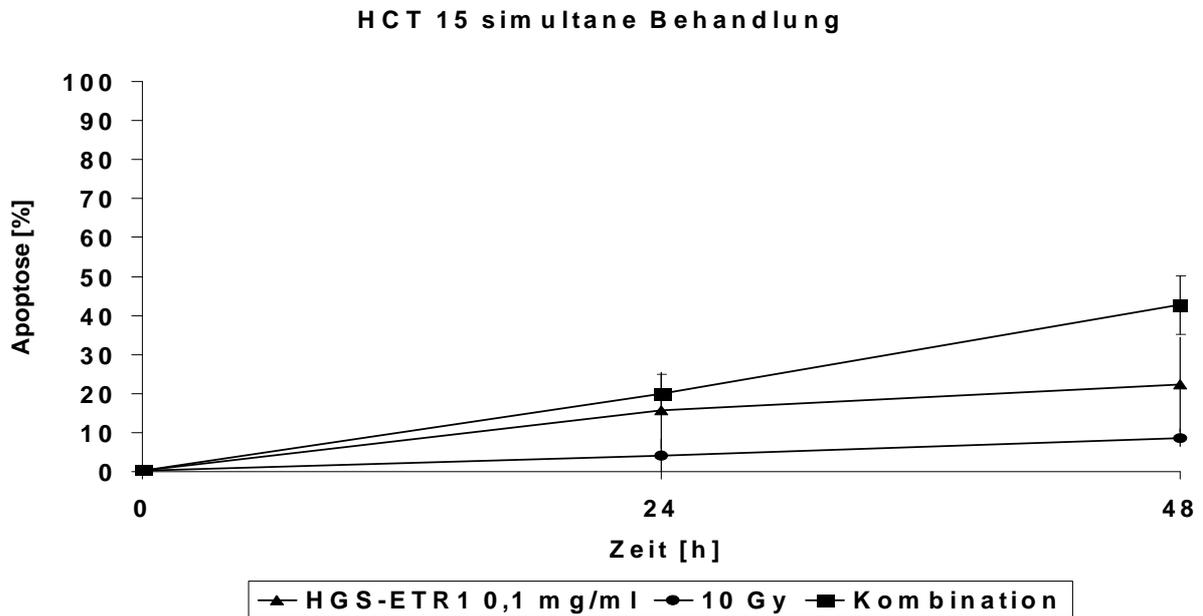


Abbildung 34: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+ 10 Gy in HCT 15, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

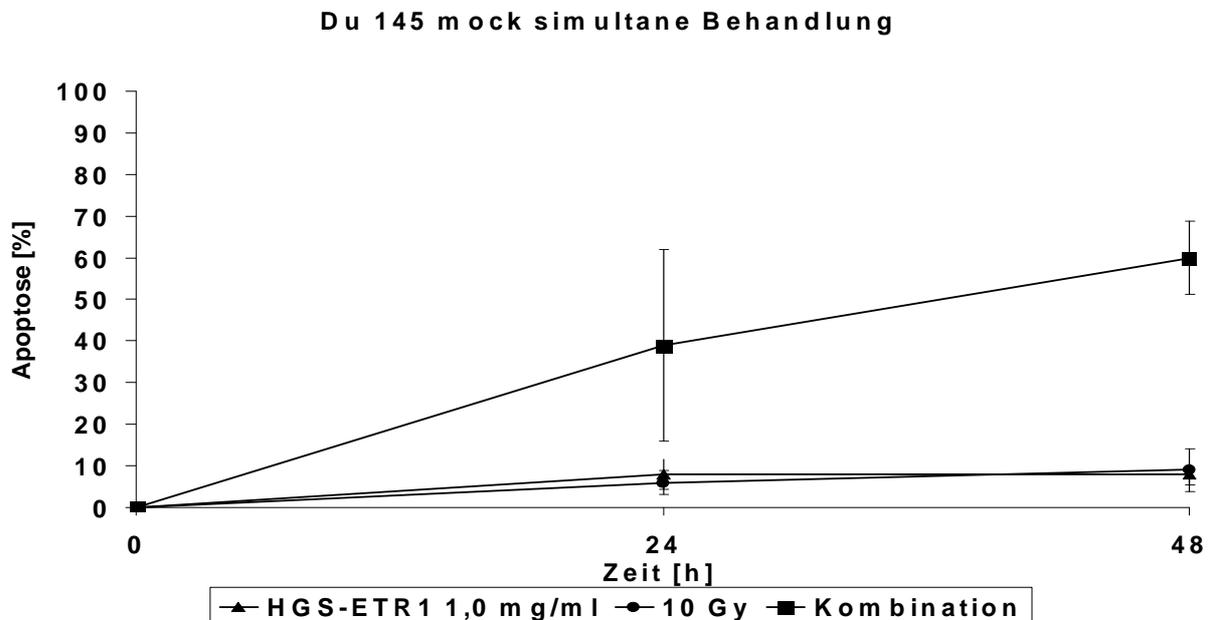


Abbildung 35: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+10Gy in Du 145 mock, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

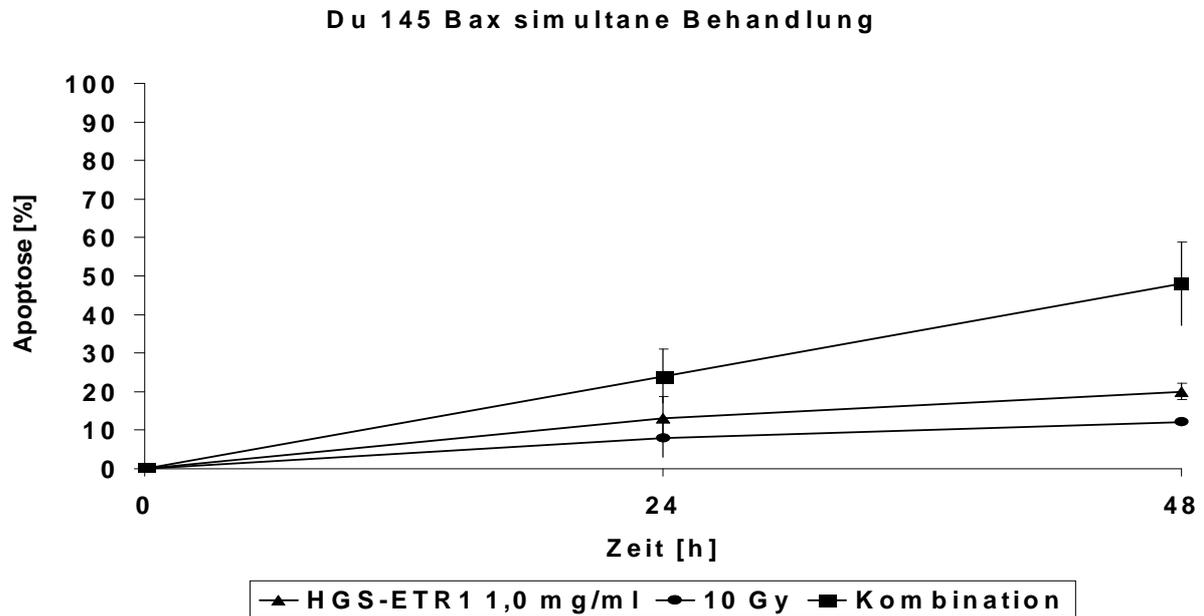


Abbildung 36: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+10 Gy in Du 145 Bax, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

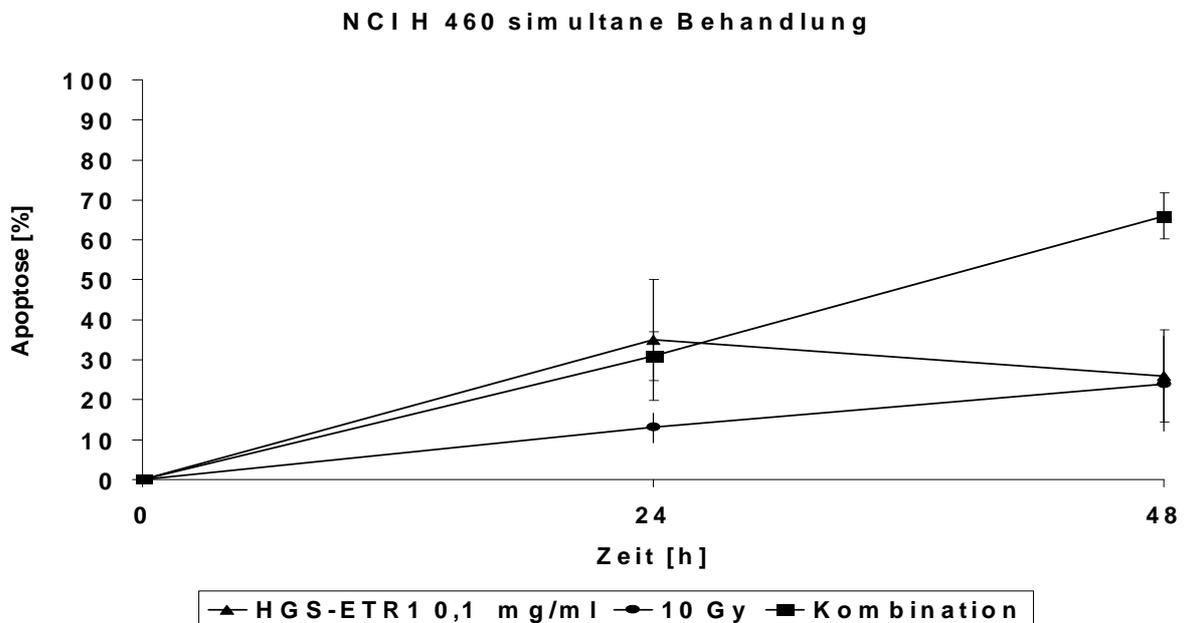


Abbildung 37: Apoptoseinduktion durch HGS- ETR 1+10 Gy in NCI H460, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

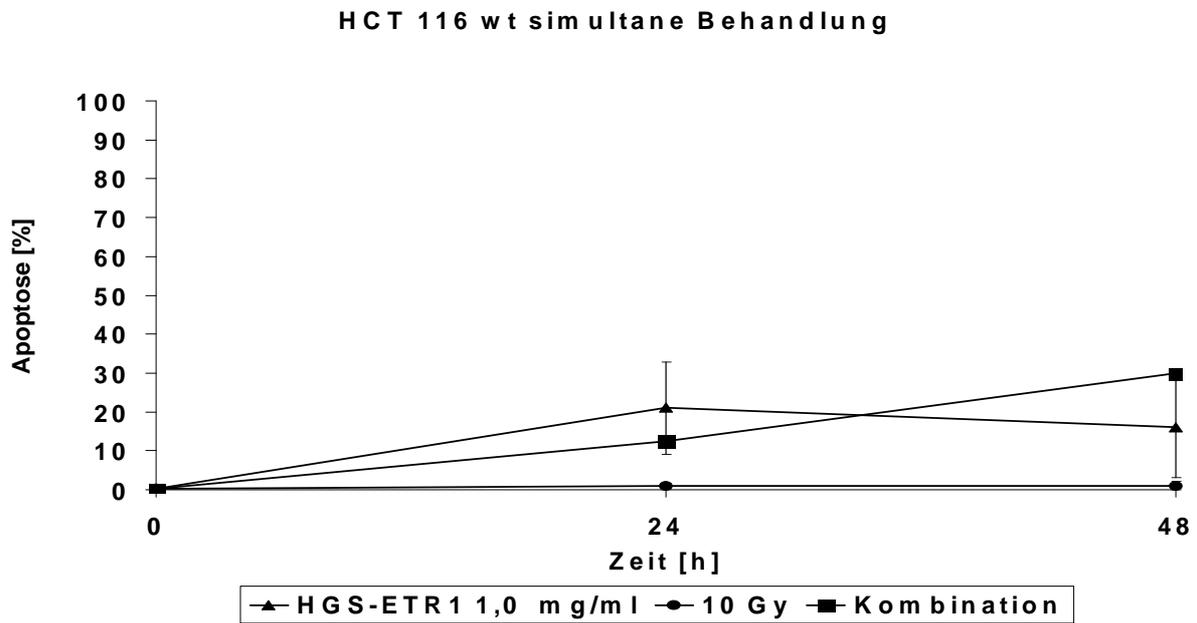


Abbildung38: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+10 Gy in HCT116wt, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

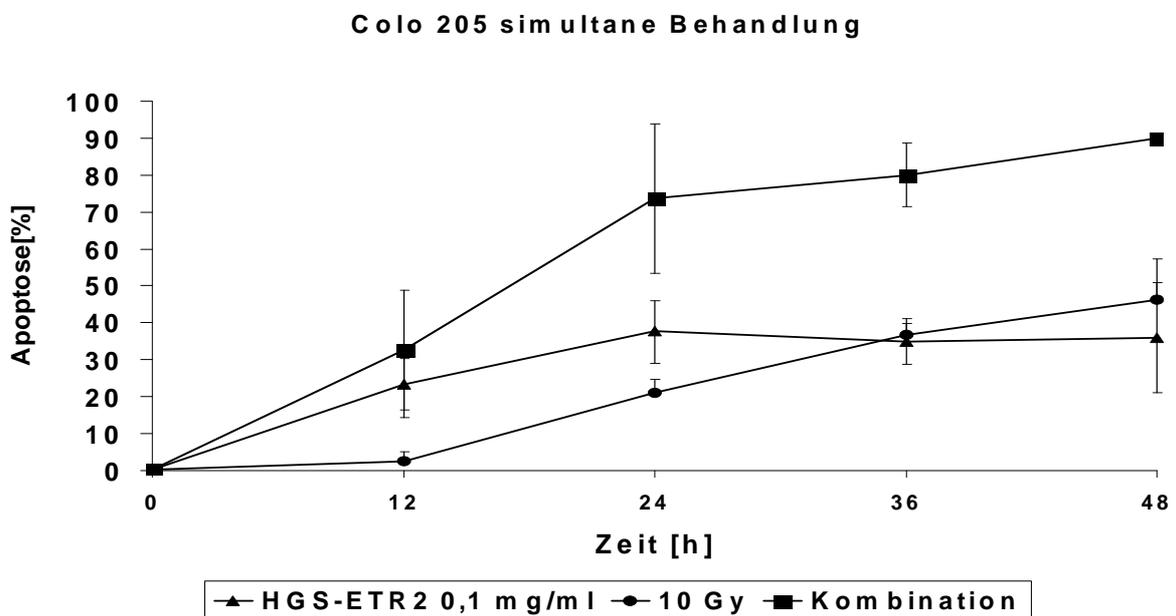


Abbildung39: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2 + 10 Gy in Colo 205, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

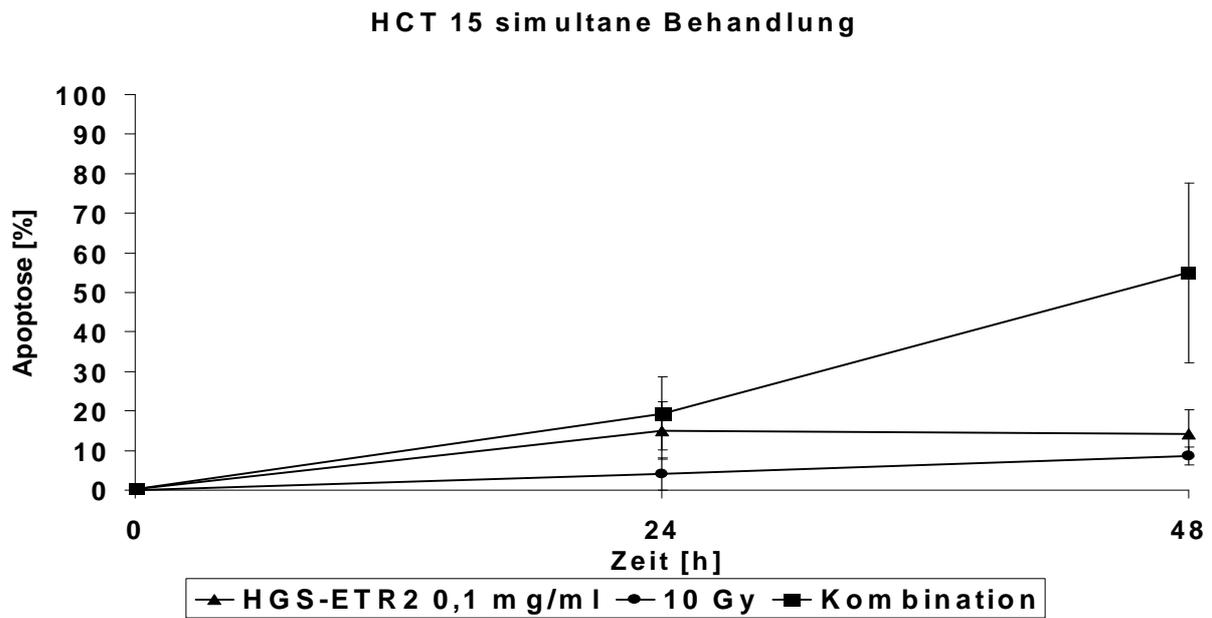


Abbildung 40: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2+10 Gy in HCT 15, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

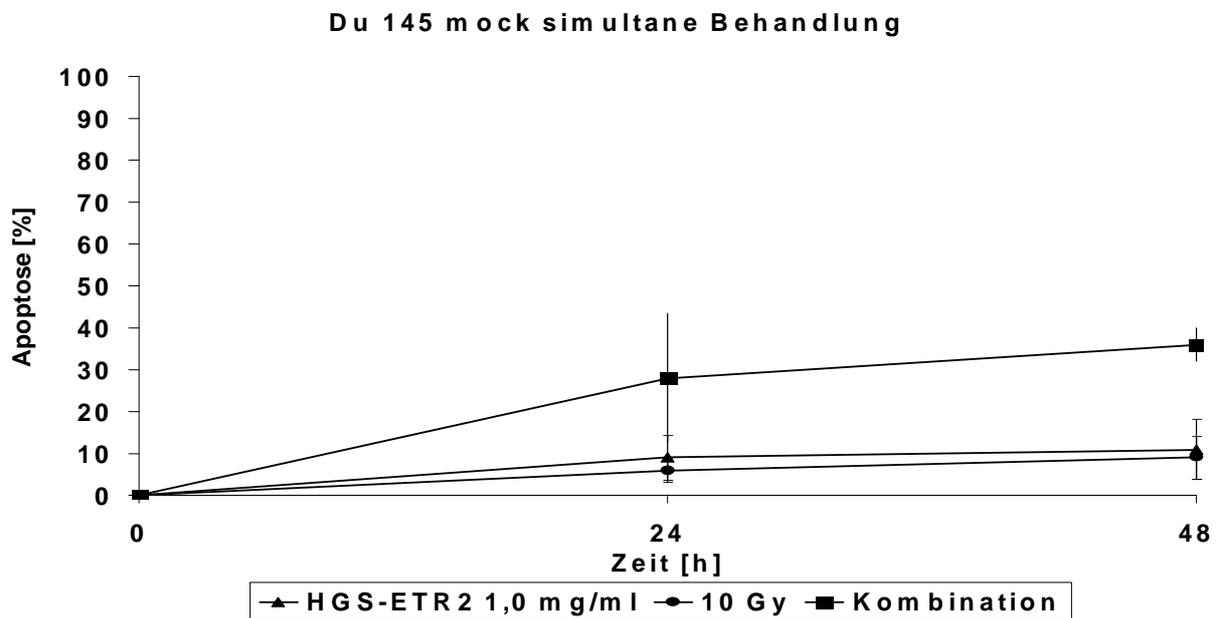


Abbildung 41: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2+ 10 Gy in Du 145 mock, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

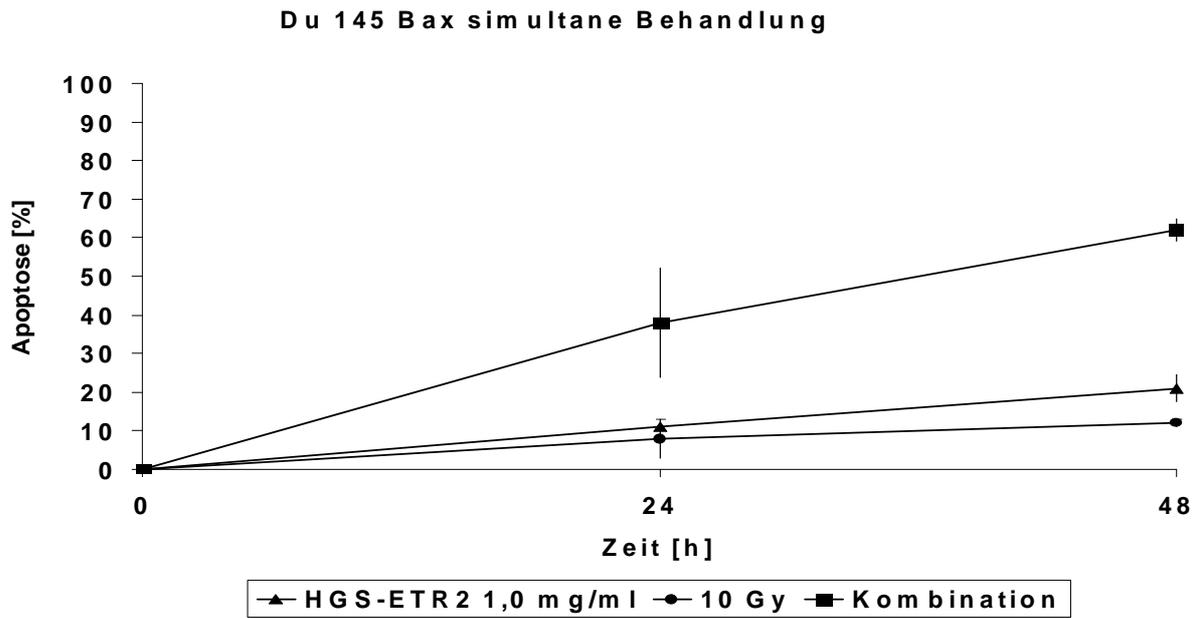


Abbildung 42: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2+ 10 Gy in Du 145 Bax, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

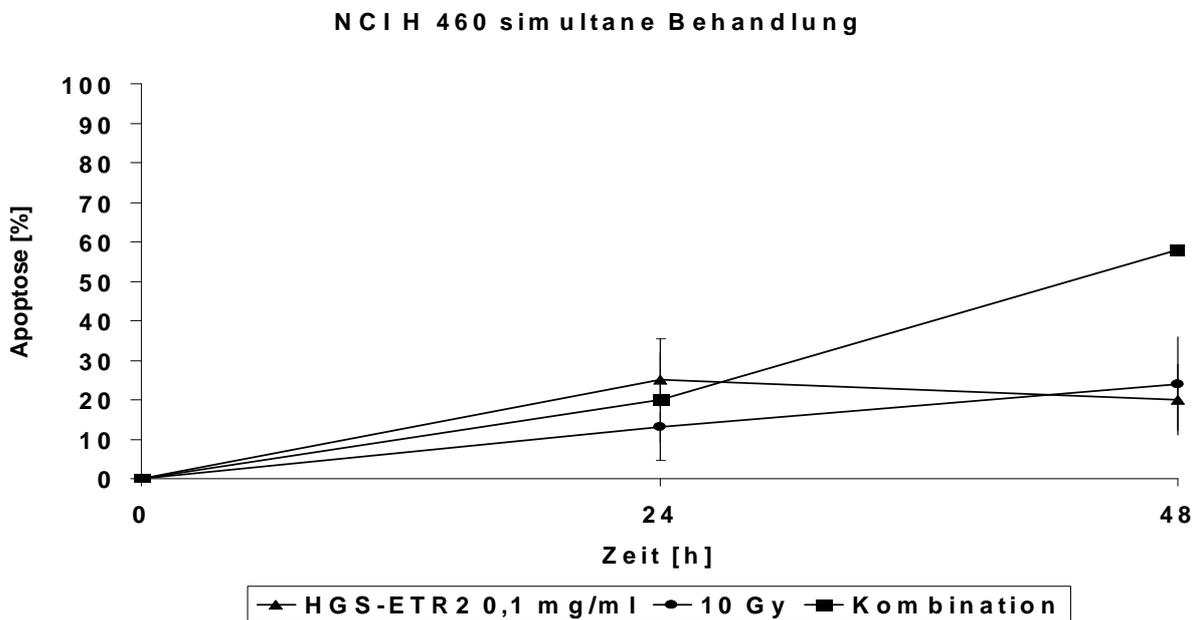


Abbildung 43: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2+10 Gy in NCI H 460, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

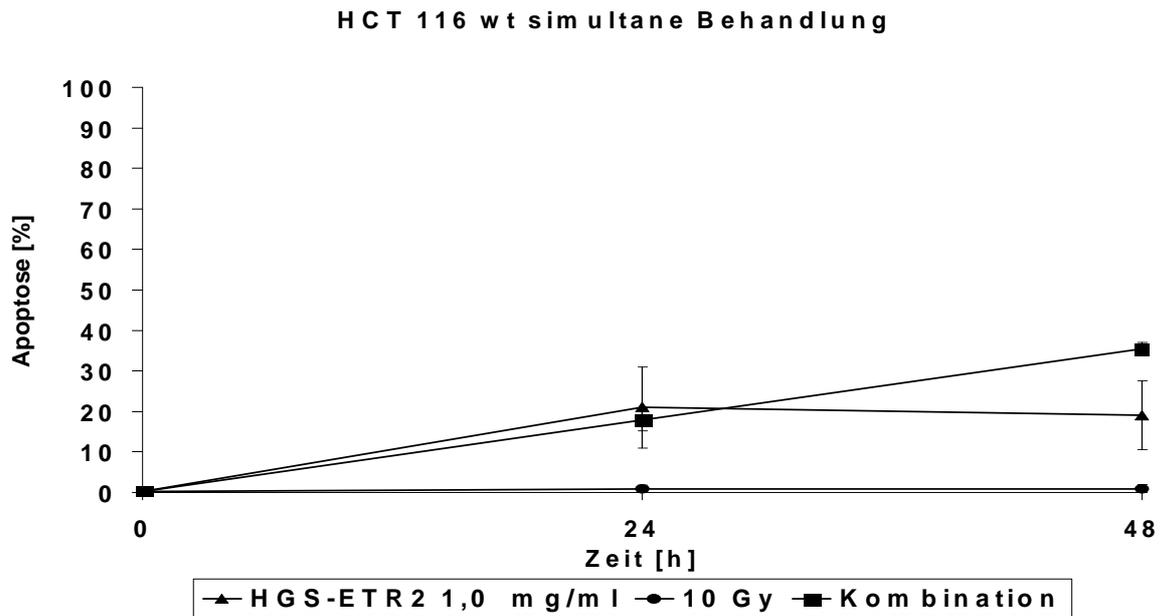


Abbildung 44: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR2+ 10 Gy in HCT 116wt 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop,

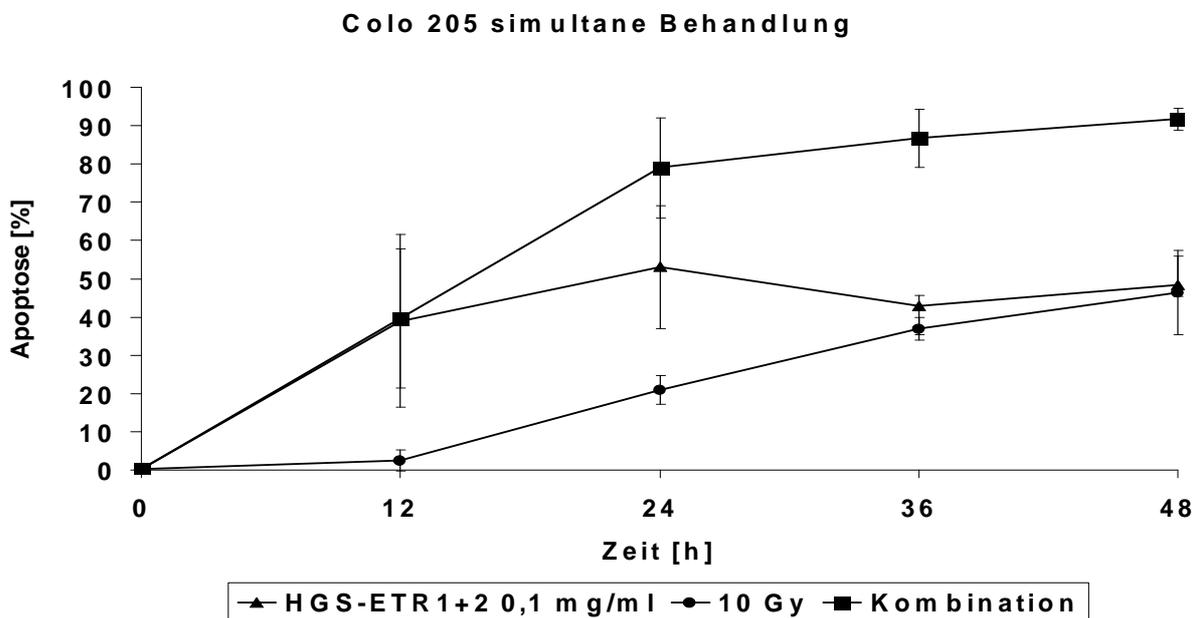


Abbildung 45: Apoptoseinduktion durch HGS- ETR1+2+10 Gy in Colo 205, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

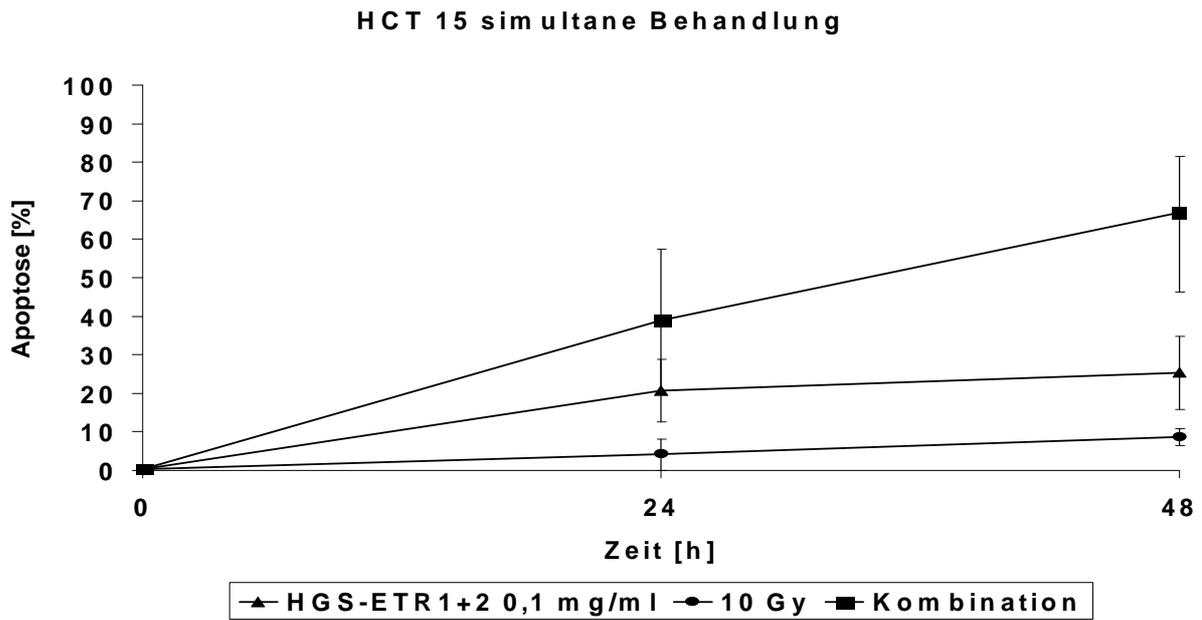


Abbildung 46: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2+10 Gy in HCT 15, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

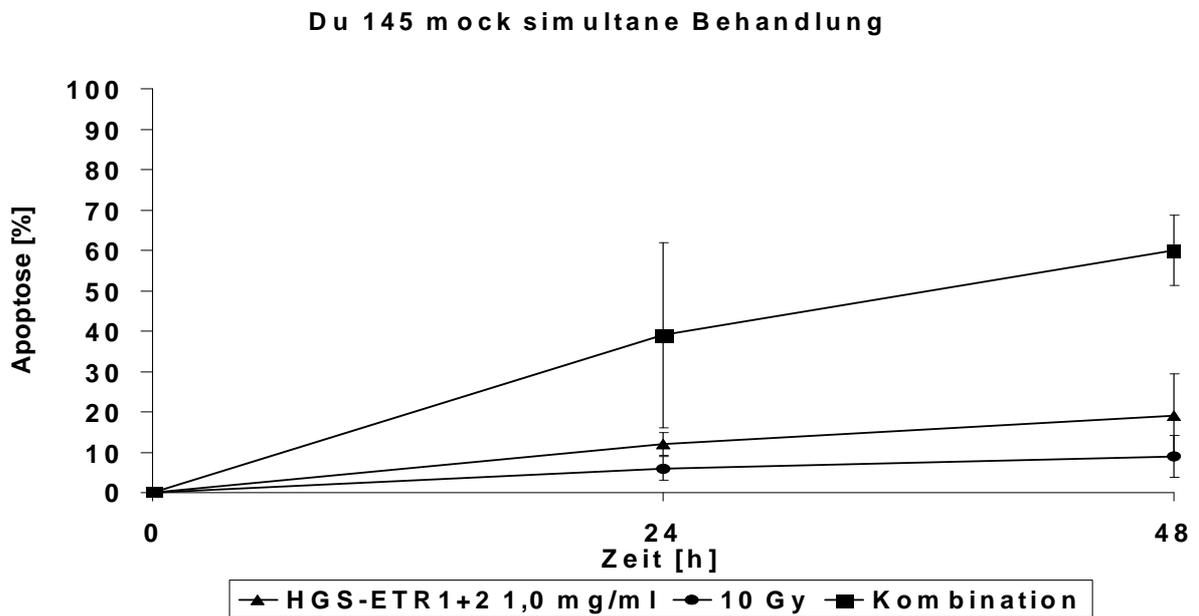


Abbildung 47: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2+10 Gy in Du 145 mock, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

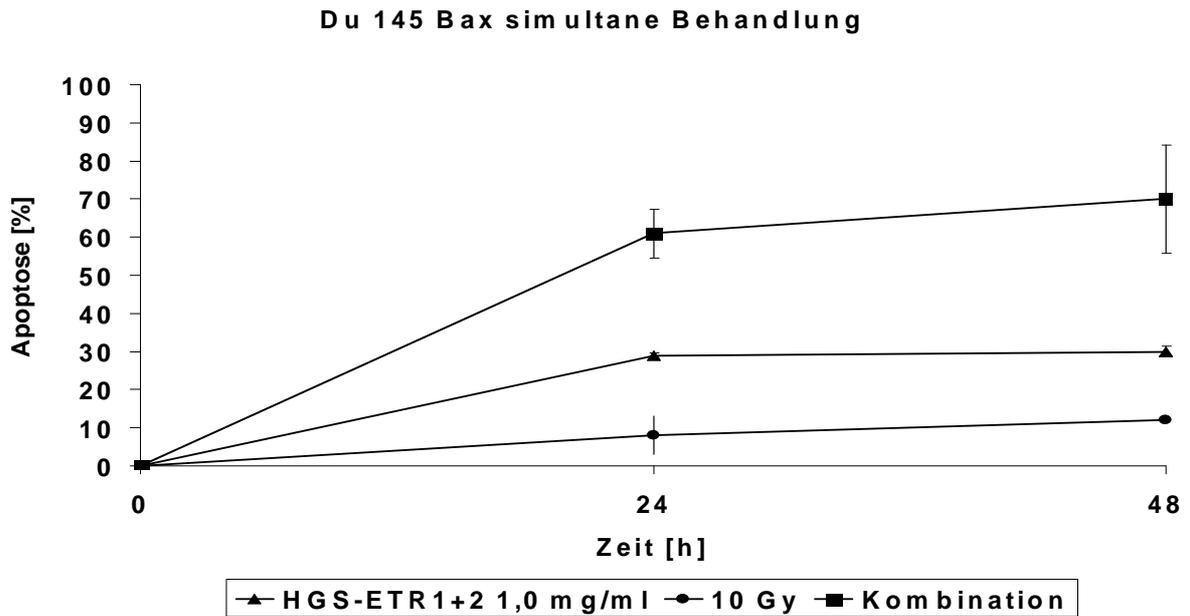


Abbildung 48: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2+10 Gy in Du 145 Bax, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

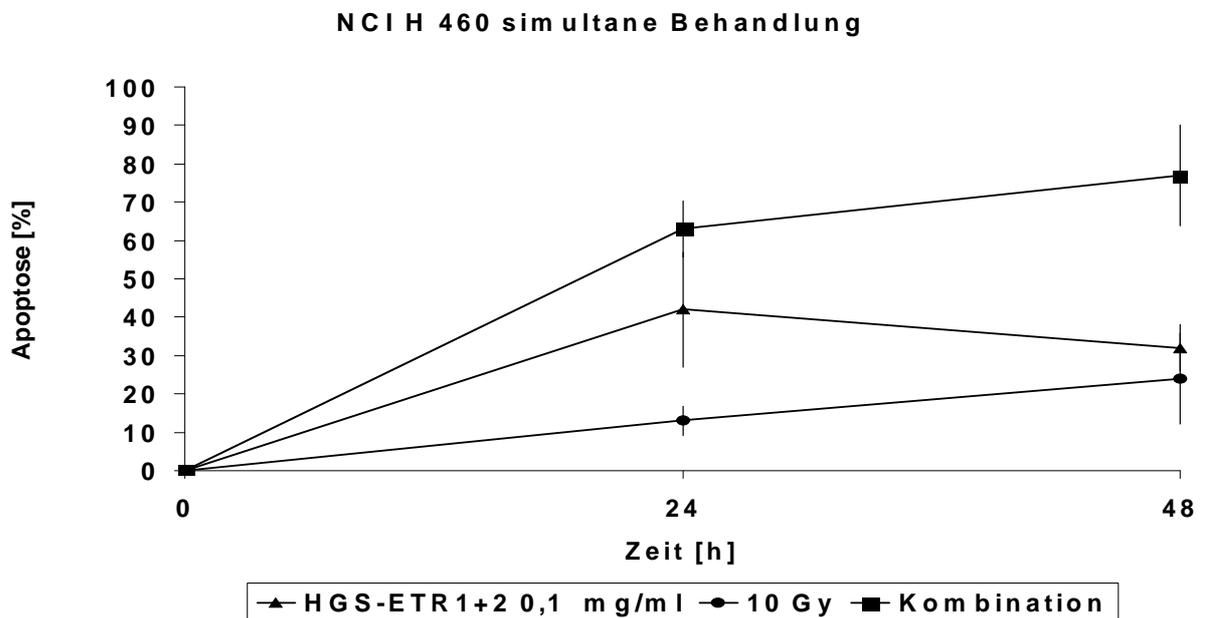


Abbildung 49: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2+10 Gy in NCI H460, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

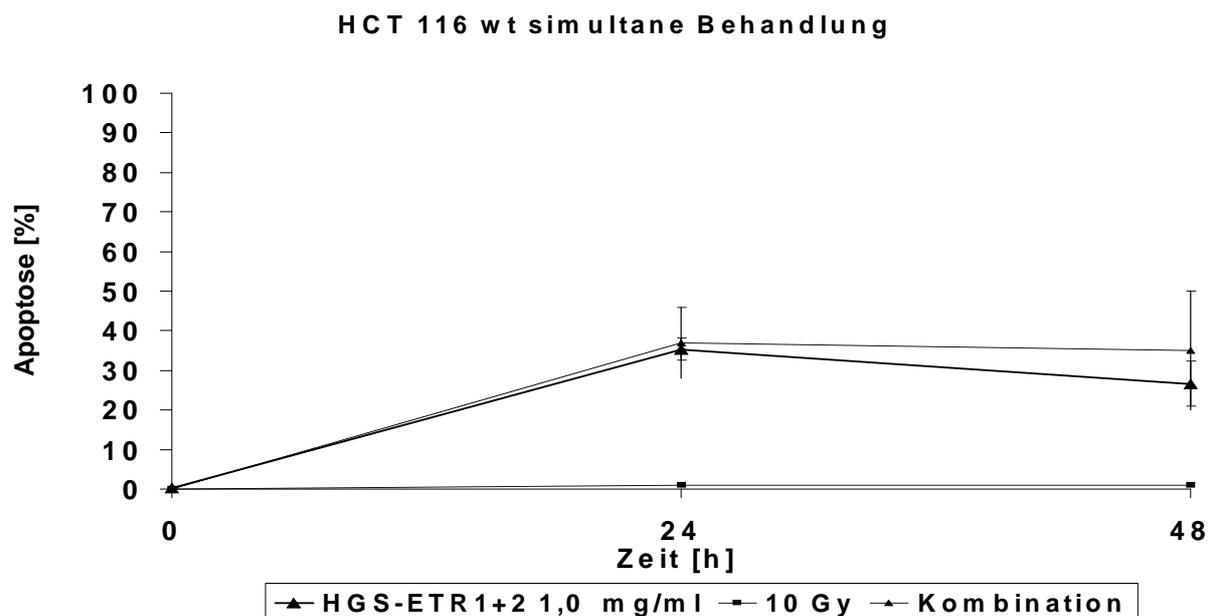


Abbildung 50: Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1+2+10 Gy in HCT 116wt, 24h und 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

In den Abbildungen 33-38 ist die Kombinationswirkung einer Bestrahlung mit 10 Gy und der Gabe des Antikörpers HGS-ETR1 dargestellt. Die Kombinationsbehandlung induziert in Colo 205-Zellen eine Apoptoserate von 92%, in HCT 15-Zellen 55%, in Du 145 mock-Zellen 62%, in Du 145 Bax-Zellen 48%, in HCT 116 wt-Zellen 32% und in NCI H 460-Zellen von 65%.

In den Abbildungen 39-44 ist das Ergebnis von Bestrahlung mit 10 Gy in Kombination mit der Gabe des Antikörpers HGS-ETR 2 dargestellt. In Colo 205 wird so eine Apoptoserate von 90%, in HCT 15 von 58%, in Du 145 mock von 38%, in Du 145 Bax von 62 %, in HCT 116 wt von 38% und in NCI H 460 von 62% erreicht.

Abbildungen 45-50 zeigen die Ergebnisse zur Kombinationsbehandlung mit 10 Gy Bestrahlung und beiden Antikörpern. In Colo 205 wird so eine Apoptoserate von 98 % induziert, in HCT 15 werden so 68% Apoptose induziert, in Du 145 mock 65%, in Du 145 Bax 72 %, in HCT 116 wt 39% und in NCI H 460 82%.

Man kann also erkennen, dass durch die Kombination mit Bestrahlung eine deutliche Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zur Antikörpergabe allein möglich ist.

Besonders deutlich wird dies z.B. bei der Zelllinie Du 145 mock. Hier steigert sich die Apoptoserate von 5 % bei HGS-ETR 1 alleine auf 62% in der Kombination mit Bestrahlung oder bei Du 145 Bax von 15 % bei HGS-ETR2 alleine auf 62% in der Kombination mit 10 Gy.

4.3 Untersuchung zur Beeinflussung der Kombinationswirkung durch Vorbestrahlung

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass Bestrahlung Zellen gegenüber TRAIL- induzierter Apoptose sensibilisiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob dies auch für die agonistischen TRAIL- Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 gilt. Dazu wurden die Zellen zuerst bestrahlt und 12 Stunden später mit den Antikörpern behandelt. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die Zellen wiederum mit dem Hoechst-Farbstoff angefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt

Es wurde auch der umgekehrte Ansatz ausprobiert, d.h. die Zellen wurden zuerst mit den Antikörpern behandelt und 12 Stunden später bestrahlt; hier zeigte sich jedoch kein Anstieg der Apoptoserate (die Diagramme werden nicht gezeigt).

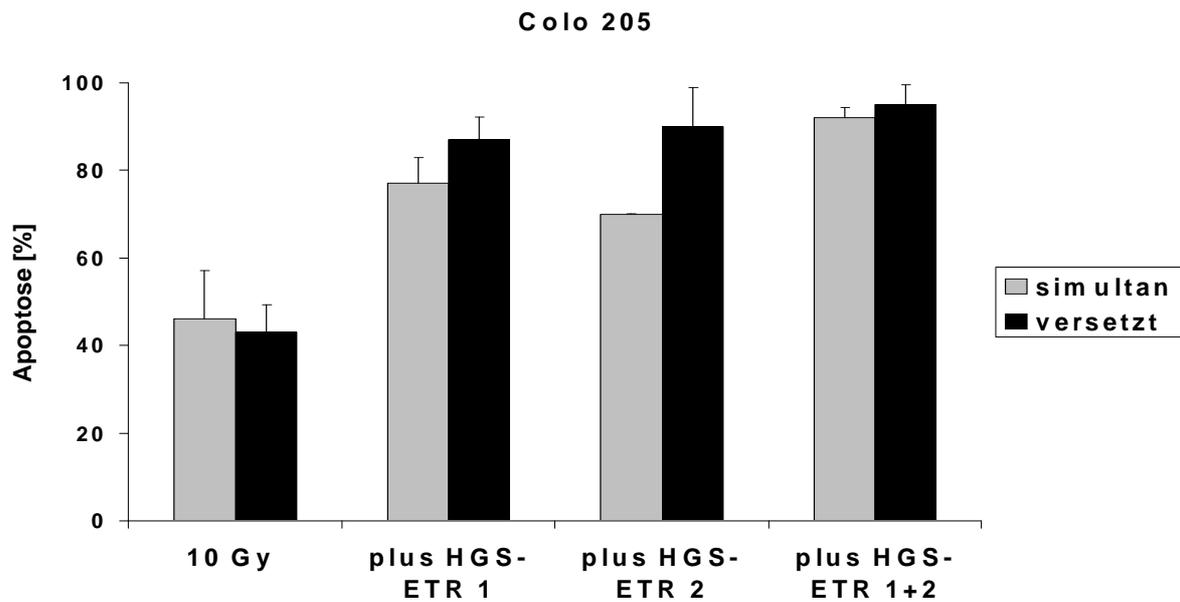


Abbildung 51: simultane Bestrahlung versus 12h Vorbestrahlung (versetzt) mit HGS-ETR1 0,1 mg/ml bzw. HGS-ETR2 0,1 mg/ml bzw. beiden Antikörpern in der Konzentration 0,1mg/ml zusammen in Colo 205, 24h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

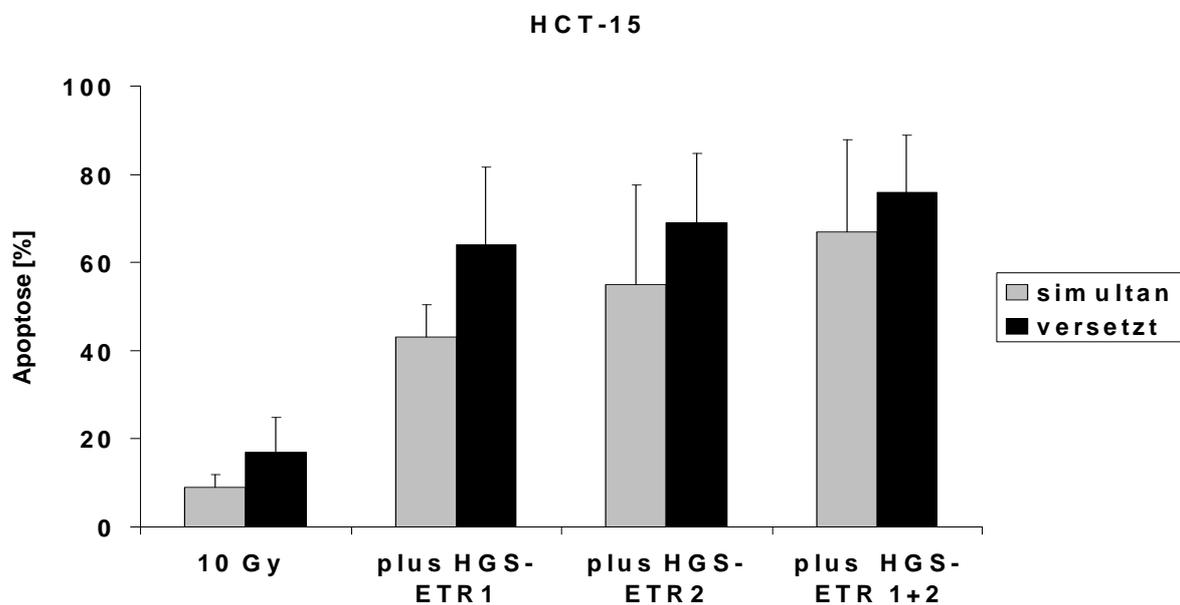


Abbildung 52: simultane Bestrahlung versus 12h Vorbestrahlung (versetzt) in Kombination mit HGS-ETR1 0,1 mg/ml bzw. HGS-ETR 2 0,1mg/ml bzw. beiden Antikörpern zusammen in der Konzentration 0,1mg/ml in HCT 15, 24h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

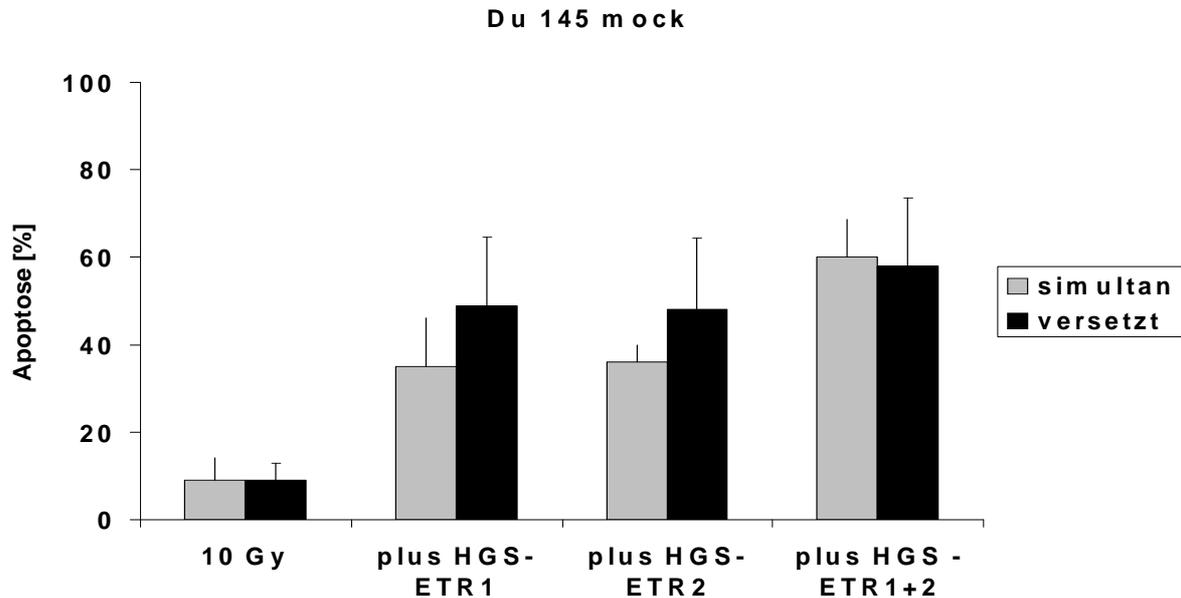


Abbildung 53: simultane Bestrahlung versus 12h Vorbestrahlung (versetzt) in Kombination mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml bzw. HGS-ETR2 1,0 mg/ml bzw. beiden Antikörpern in der Konzentration 1,0mg/ml zusammen in Du 145 mock, 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

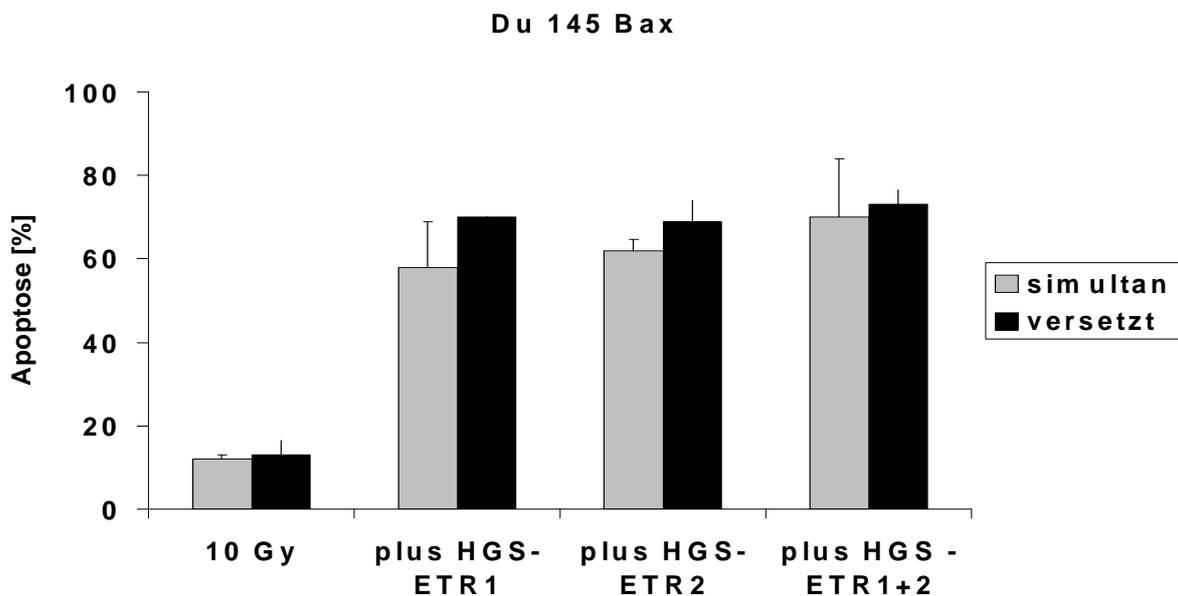


Abbildung 54: simultane Bestrahlung versus 12h Vorbestrahlung (versetzt) in Kombination mit HGS-ETR1 1,0mg/ml bzw. HGS-ETR2 1,0mg/ml bzw. beiden Antikörpern zusammen in der Konzentration 1,0mg/ml in Du 145 bax, 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

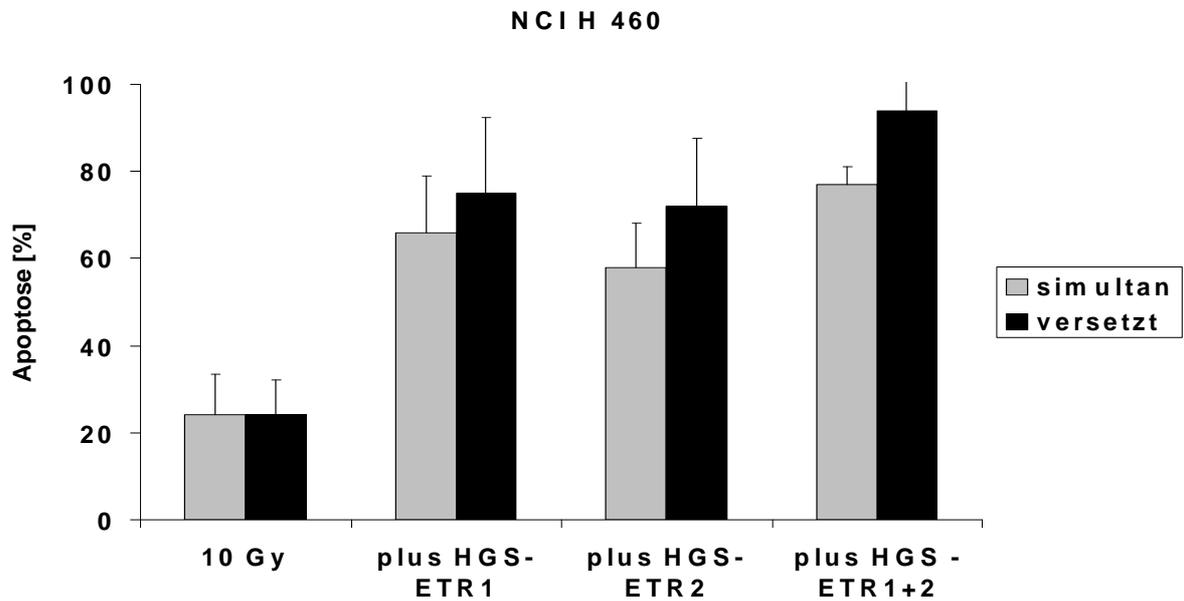


Abbildung 55: simultane Bestrahlung versus 12h Vorbestrahlung (versetzt) in Kombination mit HGS-ETR1 0,1mg/ml bzw. HGS-ETR2 0,1mg/ml bzw. beiden Antikörpern zusammen in der Konzentration 0,1mg/ml in NCI H 460, 24h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

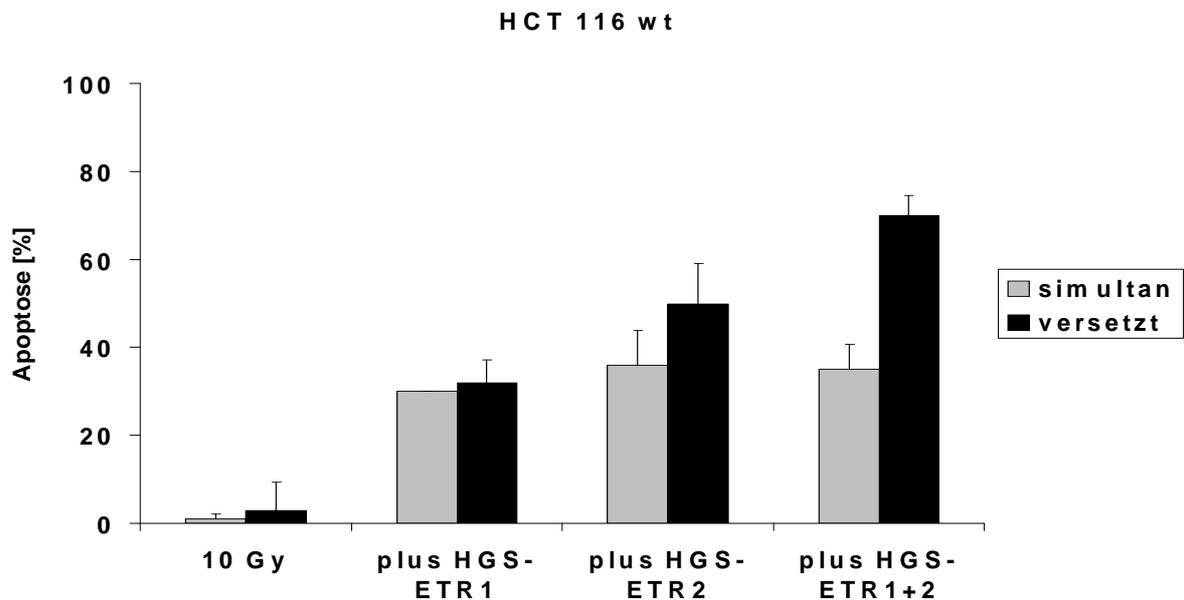


Abbildung 56: simultane Bestrahlung versus 12h Vorbestrahlung (versetzt) in Kombination mit HGS-ETR1 1,0mg/ml bzw. HGS-ETR2 1,0 mg/ml bzw. beiden Antikörpern zusammen in der Konzentration 1,0mg/ml in HCT 116 wt, 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Eine geringgradige Steigerung der Apoptoserate lässt sich durch Vorbestrahlung der Zellen, bei allen Zelllinien zeigen. In manchen Zelllinien ist der Effekt ausgeprägter, so z.B. bei der Zelllinie HCT 116 wt: hier führt die Vorbestrahlung zu einer Steigerung der Apoptoserate um 12% bei der Behandlung mit HGS-ETR2 und um 33% bei einer Behandlung mit beiden Antikörpern.

4.4 Caspasen-Aktivierung durch ionisierende Strahlung oder agonistische TRAIL- Antikörper

Zur qualitativen Validierung der quantitativen Ergebnisse diente die Westernblotanalyse. Es wurden aktivierte Caspase 8 und gespaltenes PARP nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen entweder nur mit den agonistischen Antikörpern bzw. nur mit Bestrahlung oder mit einer Kombination aus Antikörpergabe und Bestrahlung behandelt. 12 und 24 Stunden nach der Behandlung wurden aus den Zellen Lysate angefertigt. Die Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit den entsprechenden Antikörpern zum Nachweis behandelt. Zum Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung diente der Nachweis von β - Aktin.

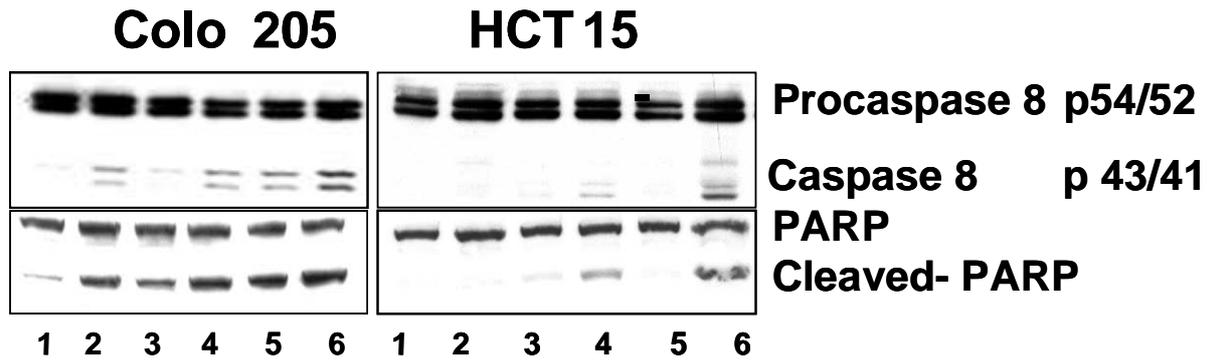


Abbildung 57: Nachweis von Caspasen -Aktivierung und PARP- Spaltung mittels Western blot-Analyse in Colo 205 und HCT 15, 12h nach Behandlung, Spur 1: Kontrolle, Spur 2: Bestrahlung mit 10 Gy alleine, Spur 3: Behandlung mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml, Spur 4: Behandlung mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml plus Bestrahlung mit 10 Gy, Spur 5: Behandlung mit HGS-ETR2 1,0 mg/ml, Spur 6: Behandlung mit HGS-ETR2 1,0 mg/ml plus Bestrahlung

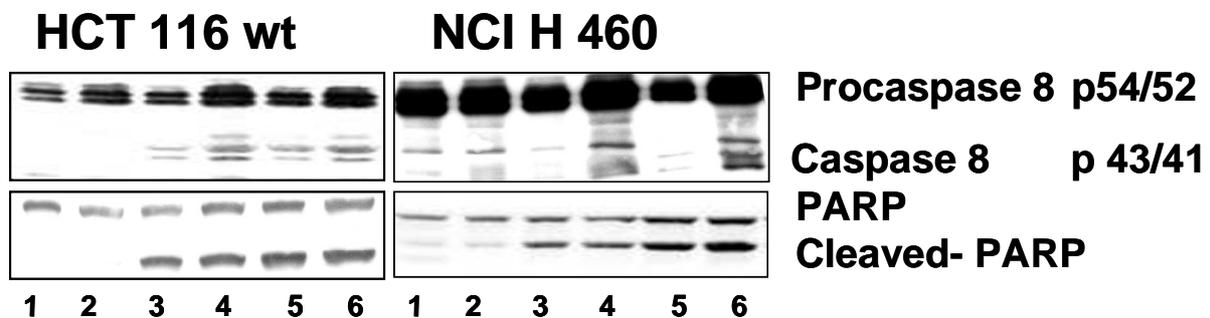


Abbildung 58: Nachweis von Caspasen- Aktivierung und PARP-Spaltung mittels Western blot-Analyse in HCT 116wt und NCI H 460, 12h nach Behandlung, Spur 1: Kontrolle, Spur 2: Bestrahlung mit 10 Gy alleine, Spur 3: Behandlung mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml, Spur 4: Behandlung mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml plus Bestrahlung mit 10 Gy, Spur 5: Behandlung mit HGS-ETR2 1,0 mg/ml, Spur 6: Behandlung mit HGS-ETR2 1,0 mg/ml plus Bestrahlung

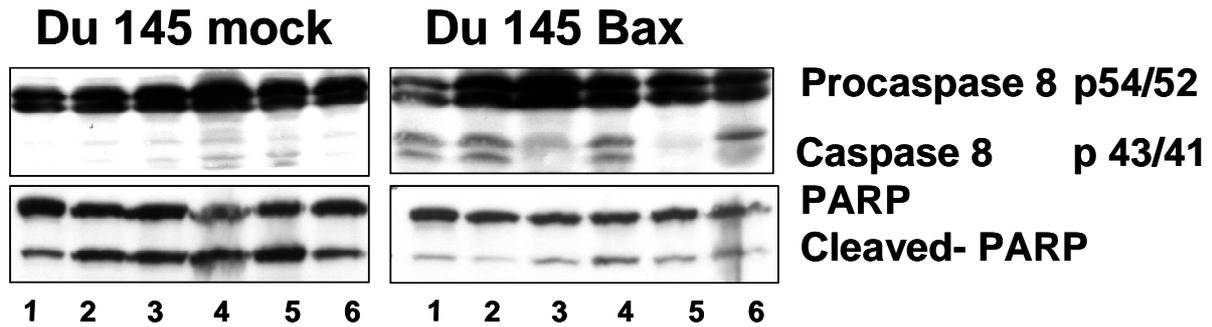


Abbildung 59: Nachweis von Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung in Du 145 mock und Du 145 Bax mittels Western blot- Analyse , 12h nach Behandlung, Spur 1: Kontrolle, Spur 2: Bestrahlung mit 10 Gy alleine, Spur 3: Behandlung mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml, Spur 4: Behandlung mit HGS-ETR1 1,0 mg/ml plus Bestrahlung mit 10 Gy, Spur 5: Behandlung mit HGS-ETR2 1,0 mg/ml, Spur 6: Behandlung mit HGS-ETR2 1,0 mg/ml plus Bestrahlung

4.5 Einfluss von Bax auf die Kombinationsbehandlung

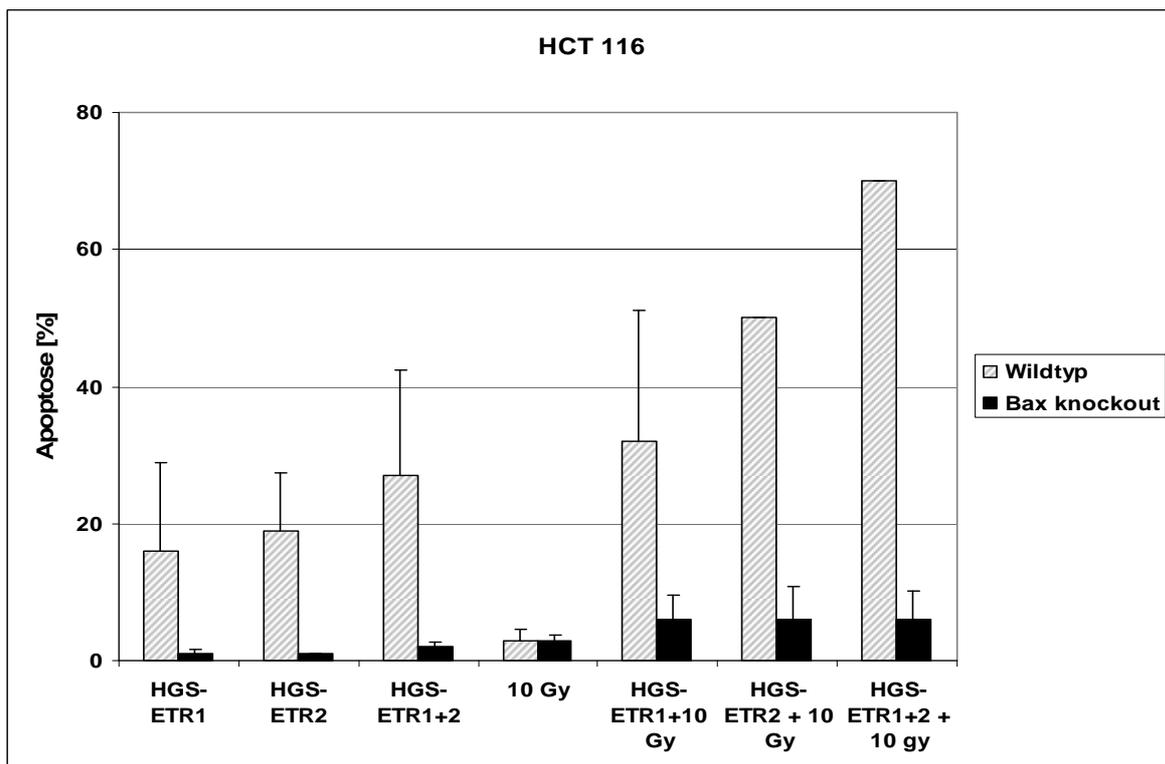


Abbildung 60: vergleichende Darstellung der Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 1,0 mg/ml, HGS-ETR2 1,0 mg/ml alleine und in Kombination in der Konzentration 1,0 mg/ml mit Bestrahlung in den Zelllinien HCT 116 wt und HCT 116 k.o., 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

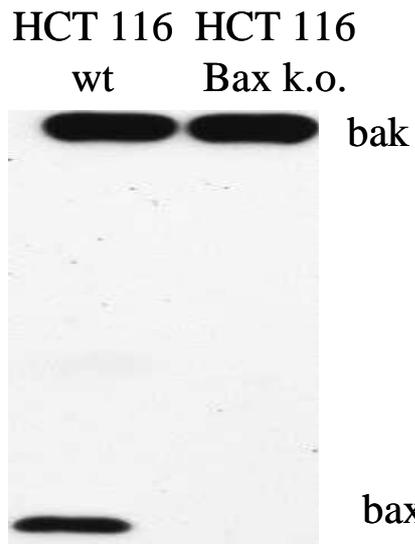


Abbildung 61:: Nachweis von Bax und Bak in HCT 116 wt und HCT 116 k.o., mittels Westernblot-Analyse in unbehandelten Zellen

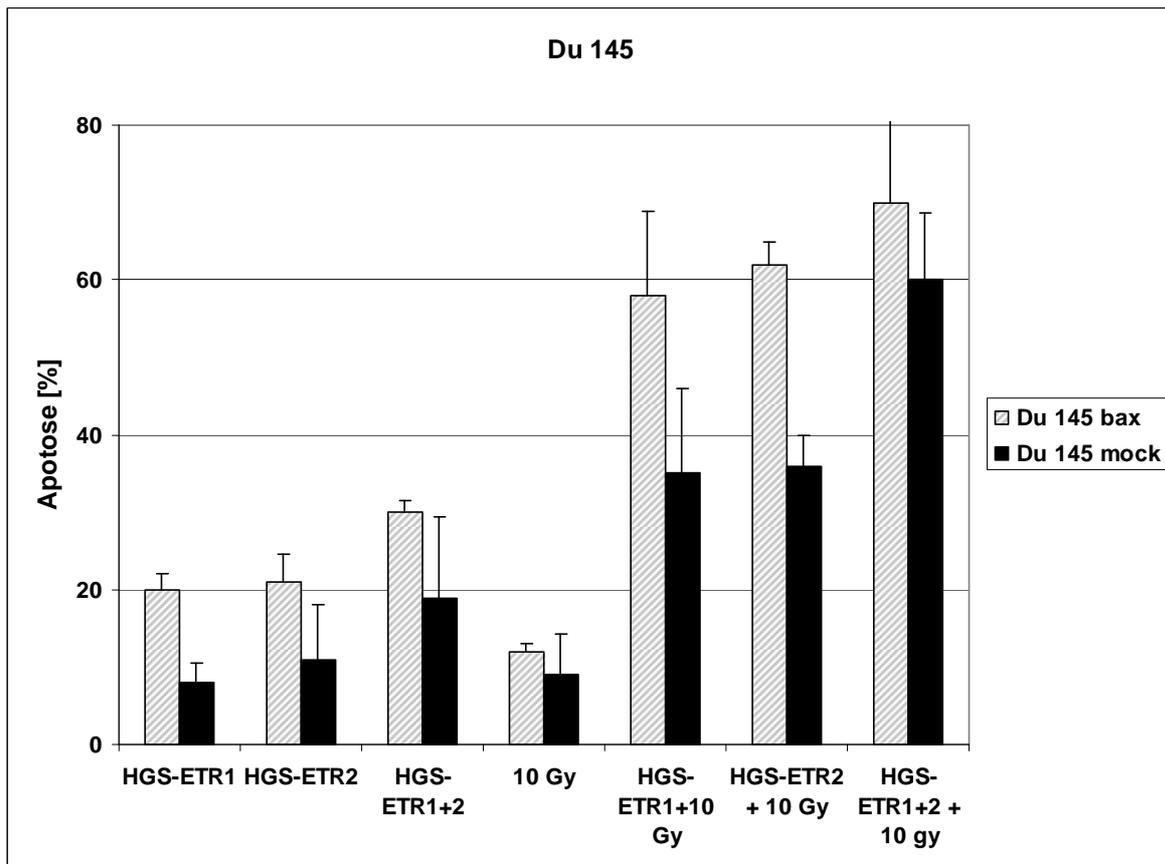


Abbildung 62: vergleichende Darstellung der Apoptoseinduktion durch HGS-ETR1 1,0 mg/ml, HGS-ETR2 1,0 mg/ml allein und in Kombination in der Konzentration 1,0mg/ml mit Bestrahlung in den Zelllinien Du 145 mock und Du 145 Bax, 48h nach Behandlung, Bestimmung der Apoptoserate durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

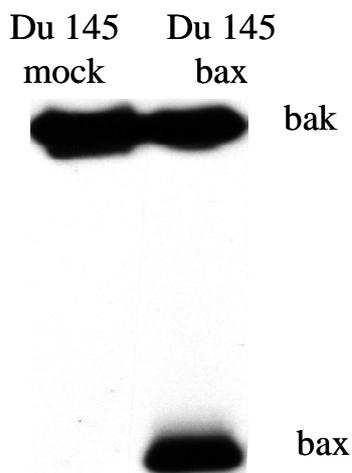


Abbildung 63: Nachweis von Bax und Bak in Du 145 mock und Du 145 Bax, mittels Westernblot-Analyse in unbehandelten Zellen

In Abbildung 59 ist deutlich zu erkennen, dass das Vorhandensein von Bax die Apoptoserate in der Kombinationsbehandlung mit HGS-ETR2 und 10 Gy von 38% bei der Zelllinie Du 145 mock auf 62% bei der Zelllinie Du 145 Bax erhöht. Dieser Effekt wird auch in Abbildung 60 gezeigt. So erhöht sich die Apoptoserate von 4 % in HCT 116k.o. auf 56% in HCT 116 wt.

4.6 Auswirkung der Kombinationsbehandlung mit agonistischen TRAIL- Antikörpern und Bestrahlung auf das klonogene Überleben

Mit den Zelllinien HCT 116 wt und HCT 116 k.o. wurden Koloniebildungstests durchgeführt, um den Einfluss der Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben zu untersuchen.

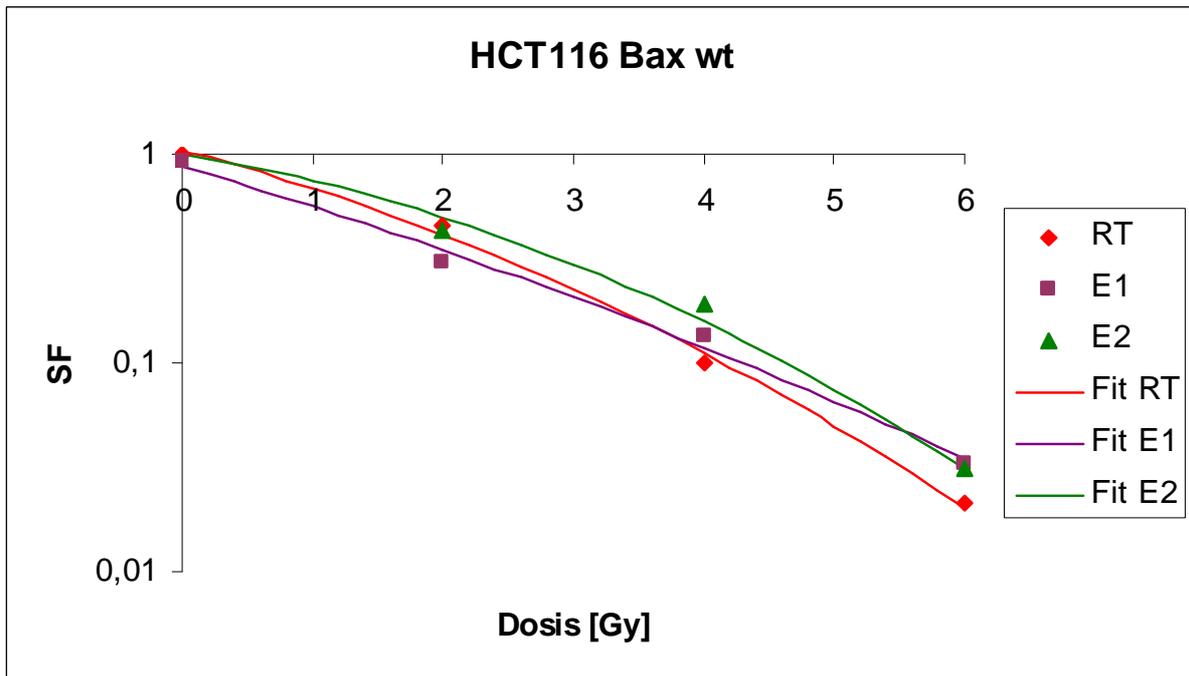


Abbildung 64: Darstellung der „surviving fraction“, gewonnen durch die Auswertung von Koloniebildungstests in HCT 116 wt für Bestrahlung alleine und die Kombination von HGS-ETR1 und Bestrahlung (E1) und HGS-ETR2 und Bestrahlung (E2)

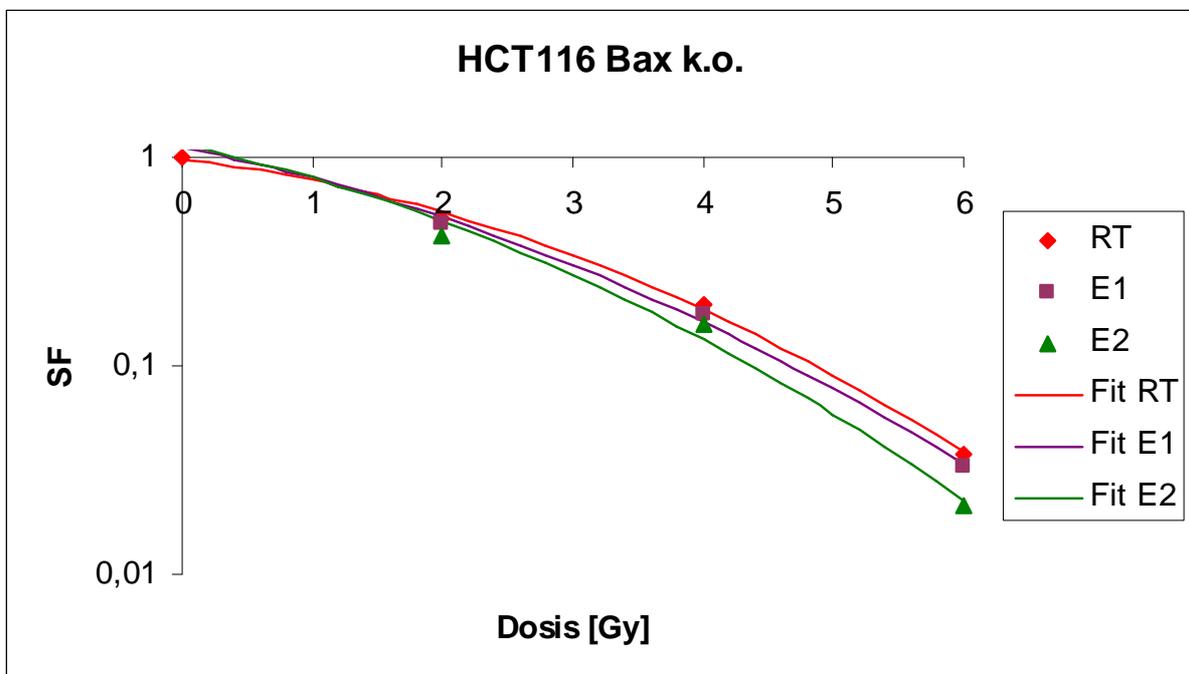


Abbildung 65: Darstellung der „surviving fraction“, gewonnen durch die Auswertung von Koloniebildungstestst in HCT 116 k.o. für Bestrahlung alleine und die Kombination von HGS-ETR1 und Bestrahlung (E1) und HGS-ETR2 und Bestrahlung (E2)

Abbildung 64 zeigt, dass in HCT 116 wt nur durch die Kombination von HGS- ETR1 und Bestrahlung eine Verbesserung des klonogenen Zelltodes gegenüber Bestrahlung alleine stattfindet. Eine Radiosensibilisierung gemessen an der Krümmung der Kurven E1 und E2 tritt bei HCT 116 wt nicht auf.

Abbildung 65 stellt die Situation bei HCT 116 k.o. dar. Hier findet bei 6 Gy in der Kombinationsbehandlung andeutungsweise eine Radiosensibilisierung statt.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Da eine Monotherapie bei der Behandlung von malignen Tumoren oft an Resistenzmechanismen der Tumorzellen scheitert, setzen moderne Therapiekonzepte auf die Kombination verschiedener Behandlungsmodalitäten.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kombinationswirkung von ionisierender Strahlung und den agonistischen TRAIL-Antikörpern HGS-ETR1 und HGS-ETR2

Es konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder alleinigen Antikörpergabe, die Apoptoserate noch deutlich steigert.

Das Ansprechen der einzelnen Zelllinien ist dabei sehr heterogen.

Ein Ansatzpunkt zur Aufklärung dieser Heterogenität ist das Protein Bax.

In genetischen Nullsystemen konnte gezeigt werden, dass Bax essentiell für die Kombinationswirkung ist.

Ein anderes proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie wie Bak, welches in den verwendeten Nullsystemen in ausreichender Konzentration vorhanden war, konnte das Fehlen von Bax nicht kompensieren.

Was die Eradikation klonogener Tumorzellen anbelangt, so ergaben die durchgeführten Koloniebildungstests kein eindeutiges Ergebnis, das für einen Vorteil der Kombinationsbehandlung spricht.

5.2 „Molecular targeting“, gezielter Angriff auf die Tumorzelle

Die Idee, die hinter dem so genannten „molecular targeting“ steckt, ist es Therapien zu entwickeln, die gezielt molekulare Signalkaskaden, die Krankheiten verursachen, zu durchbrechen, ohne dabei die normale Funktion der Zellen zu zerstören. So wurden auch in der vorliegenden Doktorarbeit durch HGS-ETR1 und HGS-ETR2 gezielt die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 aktiviert und dadurch Apoptose induziert. HGS-ETR1 und HGS-ETR2 weisen keine Normalgewebstoxizität auf.

HGS-ETR1 und HGS-ETR2 wirken jedoch nicht in allen Zellsystemen gleich.

Dafür scheint die individuelle molekulare Ausstattung der einzelnen Zelllinien verantwortlich zu sein.

Ein erster Erklärungsversuch war die unterschiedliche Expression der Rezeptoren DR4 und DR5 der verschiedenen Zelllinien.

Es wurde jedoch schon in vielen Arbeiten unter anderem von Griffith *et al.* 1999 (80) und von Luciano *et al.* 2002 (81) gezeigt, dass die Rezeptorexpression nicht mit dem Ansprechen korreliert.

Ein nahe liegendes Erklärungsmodell wären die Decoy- Rezeptoren: eine große Zahl von Decoy- Rezeptoren fängt die TRAIL- Moleküle ab und schützt die Zelle so vor Apoptose.

Auch hier besteht jedoch keine Korrelation zwischen Decoy- Rezeptor- Expression und TRAIL-Resistenz (82-84).

Weitere Moleküle, die, was TRAIL-Sensitivität anbelangt, eine wichtige Rolle spielen könnten, in der vorliegenden Doktorarbeit aber nicht untersucht wurden, sind:

- c-FLIP (85,86,89)
- Smac/ DIABLO (87)
- NF-kb (88,93)
- Proteinkinase B/Akt (90,91)
- MAP-Kinase (92)

Es wurde auch schon in Versuchen gezeigt, dass man durch Aktivierung oder Ausschaltung eines Teils der hier genannten Moleküle, die Wirkung von TRAIL verstärken und dies therapeutisch nutzen kann. Bei der Kombination TRAIL mit Proteasominhibitoren wurde eine erhöhte Apoptoserate durch die verstärkte Freisetzung von Smac/ DIABLO beobachtet (103).

Karikari *et al.* kombinierten in Pankreaskarzinomzellen „*small-molecule*“ Antagonisten von XIAP mit TRAIL und konnten einen deutlichen Synergieeffekt beobachten (104).

5.3 Die Rolle von Bax (Bcl2-associated x protein)

Es konnte gezeigt werden, dass Bax eine wichtige Rolle bei der TRAIL- induzierten Apoptose spielt.

Die dabei untersuchten Zellsysteme Du 145 und HCT 116 zeigen dabei jedoch unterschiedliche Eigenschaften, was das Ausmaß der Bax- Abhängigkeit anbelangt.

Für die Heterogenität der Bax-Abhängigkeit der Apoptose- Induktion in humanen Karzinomzelllinien gibt es verschiedene Erklärungsmodelle:

- Das Modell der Typ 1, Typ 2 –Zellen, d.h., dass es Zellen gibt, die die Aktivierung von Bax am Mitochondrium benötigen, um nach Stimulation durch TRAIL in Apoptose zu gehen und solche, bei denen die Apoptoseexekution Bax- unabhängig abläuft (94).
- Die Bedeutung des mitochondrialen Apoptosewegs und damit von Bax ist abhängig von der Inkubationsdauer mit TRAIL und von der TRAIL- Dosis (98).

Häufig wird diskutiert, ob Bak die Rolle von Bax übernehmen kann (97). Wir konnten zeigen, dass dies nicht der Fall ist, da Bak in allen Zellsystemen in gleicher Stärke vorhanden ist.

Bax stellt somit einen wichtigen Parameter für die translationale Forschung dar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Ansprechen auf die Kombinationstherapie aus Antikörpern und Bestrahlung von der jeweiligen Tumorart und deren molekularer „Ausstattung“ abhängt. Im Sinne einer „targeted therapy“ sollten daher folgende Eigenschaften des behandelten Tumors dokumentiert werden:

- Vorhandensein der TRAIL- Rezeptoren
- Vorliegen der klassischen Elemente der apoptotischen Signalkaskade
- Expression von Bax

5.4 In vivo- Modelle

Die vorliegende Doktorarbeit stellt die *in vitro*- Grundlage für die Überprüfung der Kombinationstherapie *in vivo* dar.

Die mindestens additive Wirksamkeit von HGS-ETR1 und HGS-ETR2 in Kombination mit Bestrahlung wurde von Marini *et al.* auch *in vivo* an einem Colo 205- Xenograft-Mausmodell nachgewiesen (107). Hierbei zeigte sich eine deutliche Wachstumsverzögerung der Tumoren.

Die Koloniebildungstests liefern *in vitro* kein eindeutiges Ergebnis, eine Radiosensibilisierung konnte nicht nachgewiesen werden. Im Tierversuch jedoch zeigt sich auch bei längerem Beobachtungszeitraum eine deutliche Wachstumsverzögerung der Tumore durch die Kombinationsbehandlung (110).

Ein Grund für diese Divergenz zwischen Zellkultur und Tierversuch könnte in einem unterschiedlichen zeitlichen Schema der Kombination von Bestrahlung und Antikörpergabe liegen. Letztlich ist die Ursache jedoch unklar.

5.5 Ausblick

Wir haben gezeigt, dass die Kombination aus Bestrahlung und TRAIL – Antikörpergabe *in vitro* wirkt, gleiches konnte auch im Mausmodell gezeigt werden.

Zahlreichen Phase 1 und 2- Studien mit den agonistischen TRAIL-Antikörpern entweder als Monotherapie (108) oder in Kombination mit Chemotherapeutika (Gemcitabin und Cisplatin) (102,109) oder Proteasominhibitoren (105) liefern viel versprechende Ergebnisse.

Jetzt stehen klinische Studien zur Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung mit HGS-ETR1 und HGS-ETR2 und Bestrahlung an.

Hierbei kommt es auf einen translationalen Ansatz an, so dass nur die Patienten behandelt werden, die aufgrund der genetischen Eigenschaften ihres Tumors auch von der Therapie profitieren.

Wie man erkennen kann, eröffnet die Kenntnis der molekularen Apoptosemechanismen eine Vielzahl von Therapieansätzen. Die Zukunft der onkologischen Therapie wird in der so genannten „patient tailored therapy“ liegen. Das heißt jeder Patient bekommt eine speziell auf seinen Tumortyp und dessen molekulare Ausstattung zugeschnittene Therapie, die verschiedene Ansatzpunkte miteinander kombiniert.

6 Zusammenfassung

Normalgewebstoxizität und Resistenzmechanismen stellen immer noch ein großes Problem moderner Tumorthera­piekonzepte dar.

Durch Kombination verschiedener Therapieansätze und durch den Einsatz von Agenzien, die gezielt ein bestimmtes fehlgesteuertes Protein der Tumorzelle angreifen („molecular targeting“), hofft man dieses Problem zu lösen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kombinationswirkung von ionisierender Strahlung und den agonistischen TRAIL-Antikörpern HGS-ETR1 und HGS-ETR2

Es konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder alleinigen Antikörpergabe, die Apoptoserate noch deutlich steigert.

Das Ansprechen der einzelnen Zelllinien ist dabei sehr heterogen.

Ein Ansatzpunkt zur Aufklärung dieser Heterogenität ist das Protein Bax.

In genetischen Nullsystemen konnte gezeigt werden, dass Bax essentiell für die Kombinationswirkung ist.

Ein anderes proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie wie Bak, welches in den verwendeten Nullsystemen in ausreichender Konzentration vorhanden war, konnte das Fehlen von Bax nicht kompensieren.

Was die Eradikation klonogener Tumorzellen anbelangt, so ergaben die durchgeführten Koloniebildungstests kein eindeutiges Ergebnis, das für einen Vorteil der Kombinationsbehandlung spricht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination von agonistischen TRAIL-Antikörpern und Bestrahlung wirkt. *In vitro* wird so eine deutliche Steigerung der Apoptoserate erreicht. Marini *et al.* konnten den gleichen Effekt *in vivo* beobachten. Klinische Studien zur Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung im Rahmen eines translationalen Behandlungskonzepts sollen nun folgen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Belka, C. 2006. The fate of irradiated tumor cells. *Oncogene* 1. 00 : 1 – 3.
- 2 Herrmann, Th. , Baumann, M. , Dörr, W. 2006. *Klinische Strahlenbiologie*. Elsevier, pp. 8 – 20.
- 3 Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.: 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *BR.J.Cancer* 26,239-237
- 4 Zeisl, M., Jacittela, M. 2001. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 589 – 598.
- 5 Rohn, T. T., Head, E., Nesse, W. H., Colman, C. W., Cribbs, D. H. 2001. Activation of caspase 8 in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* 8: 1006 – 1016.
- 6 Sanchez Mejia, R. O., Friedländer, R. M. 2001. Caspases in Huntington's disease. *Neuroscientist* 8:1006 – 1016.
- 7 Lee, J. M. , Bernstein, A. 1995. Apoptosis, cancer and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev.* 14: 149 – 161.
- 8 Zong, W. X., Ditsworth, D. Bauer, D: E. , Wang, Z. Q., Thompson, C. B. 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 18:1272-1282.
- 9 Savill, J., Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. 2000. *Nature* 407: 784-788.
- 10 Gerschenson, L. E. and Rotello, R. J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6:2450-2455.
- 11 Ellis, R. E., Yuan, J. Y., Horvitz, H. R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698

-
- 12 Nicholse, D. W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell death and Differentiation* 6: 1028-1042.
 - 13 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.
 - 14 Xue, D., Shaham, S., Horvitz, H. R. 1993. The *C. elegans* cell death protein *ced-3* is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of human CPP32 protease. *Genes. Dev.* 10: 1073-1083.
 - 15 Zou, H. , Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., 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.
 - 16 Hengartner, M. O., Horvitz, H. R. 1994. *C. elegans* survival gene *ced-5* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665-676
 - 17 Willis, S., Day, C. L., Hinds, M. G, Huang, D. C. S. The *bcl-2* regulated apoptotic pathway. *Journal of Cell Science* 116:4053-4056.
 - 18 Bouillet, P., Strasser, A. 2002. BH3- only proteins- evolutionarily essential for initiating programmed cell death. *Journal of Cell Science* 115: 1567-1574.
 - 19 Jin, Z., El-Deisg, W. S. 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biol. Thes.*4:2,139-163.
 - 20 Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J.1998. Cleavage of bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94:491-501
 - 21 Luo X, Budihardjo J, Zuo H, Slaughter C, Wang X.1998. Bid a bcl-2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* ,94: 481-90
 - 22 Enasi, M., Sahahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Ngala, S. 1998. A caspase activated drase that degrades DNA during apoptosis and its inhibition *icad*. *Nature* 391:43-50.

- 23 Ricci, J. E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly Maitre, B., Perkins, G. A., Yadavy, N.,
- 24 Scheffler, I. E., Ellismann, M. H., Green, D: R. 2004. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of p75 subunit of complex i of the electron transporter chain. *Cell* 117:773 – 786.
- 25 Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., Mc Garry, T. J.,Kirschner, M. W. Koths, K., Kwiatkowski, D. J., Williams, L. T. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.
- 26 Ku, N. O., Ziao, J., Omary, M. B. 1997. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J. Biol. Chem.* 272: 33197 – 33203.
- 27 Schmeiser, K., Hammond, E. M., Roberts, S., Grand, R. J. 1998. Specific cleavage of gammaicatenin by caspases during apoptosis. *FEBS Lett.* 433: 51-57.
- 28 Oliver, F. J., Menissier de Murcia, J. de Murcia, G. 1999. DNA repair `99 Poly (ADP-Ribose)Polimerase in the Cellular Response to DNA damage, Apoptosis and Disease. *Am. J.Human Genet.* 64 (5): 1282 – 1288.
- 29 Lerkau, B., Koyama, H., Raines, E. W., Clurman, B. E., Henen, B. Orth, K., Roberts, J. M., Ross, R. 1998. Cleavage of p21 Cip 1/Waf 1 and p27 Cip 1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdh 2: role of caspase cascade. *Mol. Cell* 1:553-563.
- 30 Zhou, B. B., Li, H., Yuan, J., Kirschner, M. W. 1998. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinase during FAS-induced apoptosis in Juskat cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 6785-6790.
- 31 Crook, N. E., Clem, R. J., Milles, L. K., 1993. An apoptosis- inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol* 67: 2168- 2174.
- 32 Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Takahashi, R. 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of x-linked inhibition of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of casapase-3 and enhances its antiapoptotic effect in FAS-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8662-8667.
- 33 Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.

-
- 34 Vaux, D. L., Cory, S., Adams, J. M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442.
- 35 Oltvai, Z., Mittleman, C. and Korsmeyer, S. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
- 36 Huang, D. C. S. and Strasser, A. 2000. BH3-only proteins-essential inhibitors of apoptotic cell death. *Cell* 103:839-842.
- 37 Bouillet P, Strasser A, 2002. Bax and Bak: Back-bone of T-Cell death. *Nat. Immunol*, 3 (10): 893-894
- 38 Korsmeyer SJ, Shutter VR, Veis DJ, Merry DES, Oltvai ZN 1993 Bcl-2/Bax : a rheostat that regulates an antioxidant pathway and cell death. *Semin cancer Biol* 4 (6): 327-32
- 39 Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Casvalho, A.C.P., Rosenstock, T. R., Shaspe, J. C., Youle, R. J. 2003. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J. Med. Biol. Res.* 36(2):183-190.
- 40 Wolter, K. G., Hsu, Y. T. Smith, C. L., Nechustan, A. Xi, X. G., Youle, R. J. 1997. Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139:1281-1292.
- 41 Krajewski, S., Krajewska, M. and Reed, J. C. 1996. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res.* 56:2849-2855.
- 42 Waterhouse, N. J. Ricci, J. E. and Green, D. R. 2002. And all of a sudden it's over: Mitochondrial outer-membrane permeabilisation in apoptosis. *Biochemie* 4:113-121.
- 43 Reed, J. C. 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2 / Bax family proteins: mechanisms, physiological roles and therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation* 13:1378-1386.

- 44 Deckwerth, T.L., Elliott, J. L., Knudson, C. M., Johnson, J. E. M., Snider, W.D., Korsmeyer, S. 1996. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17: 401-411.
- 45 Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahas, P, Frauwith, K. Chen, Y., Wie, H., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., Mac Gregor, G. R. and Thompson , C.B. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cel* 6:1389-1399.
- 46 Wei, M.C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsahopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A. Mac Gregor, G. R., Thompson, C. B., Kersmeyer, S. J. 2001. Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
- 47 Packham, G., Stevenson, F. K., 2005. Bodyguards and assassins:Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 114:441-449.
- 48 Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449.
- 49 Green, D. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunt scissors. *Cell* 102:1-4.
- 50 Hunt, A., Evan, G. 2001. Till death us does apart. *Science* 293:1784-1785.
- 51 Verhagen, A.M., Ellert, P. G., Pakusch, M. et al. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by bending to and antagonizing IAP protein. *Cell* 102:43-53.
- 52 Jin Z, El-Deiry WS 2005. Overview of cell death signalling pathways. *Cancer biology andTherapy* 4:2:139-163
- 53 Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nature Cancer* 2:420-430.
- 54 Casswell, E.A. et al. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 72:3666-3670.

-
- 55 Schneider, P., Tschopp, J. 2000. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm. Acta Helv.* 74:281-286.
- 56 Bamberg, M., Molls, M. Sack, H. Radioonkologie, Band 1: Grundlagen, Zuckerschwerdt Verlag.
- 57 Yin, X. et al. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas- induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400:886-891.
- 58 El-Deiry, W. S. 2001. Insights into cancer therapeutics based on p53 and TRAIL receptors signaling. *Cell Death Differ.* 8:1066-1075.
- 59 Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. 2000. Caspases – Controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1477:299-306.
- 60 Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S. et al. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271: 12687 – 12690.
- 61 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* 3:673:682.
- 62 Cretney, E., Takeda, K., Yagila, H., Glaccum, M. Peschen, J. J., Smyth, M. 2002. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF- related apoptosis inducing ligand- deficient mice. *J. Immunol.* 168: 1356-1361.
- 63 Sedges, L. M., Glaccum, M. B., Schuh, J. C., Kanaly, S. T., Williamson, E. Kayagahi, N. Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., Gliniak, B. 2002. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis inducing ligand TRAIL / Apo-2, using TRAIL/ Apo-2 I deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 32:2246- 2254.
- 64 Lamhamedi-Chorradi SE, ZHeng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH 2004. Defective Zhymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL -/- mice. *Nat Immunol* 4::255-60
- 65 Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F. et al. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-818.

- 66 Zamhamed-Cherrachi, S. E., Zheng, S. J., Maguschak, K. A., Peschon, J. Chen, Y. H., 2003 defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL - / - mice. *Nat. Immunol.* 4:255-160.
- 67 Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., et al. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-113
- 68 Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., et al. 1997. TRAIL-R2. A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16: 5386-5397.
- 69 Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., Du Bose, R. F., Goodwin, R. G., Smith, C. A. 1997. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186: 1165-1170.
- 70 Emery, J. G., Mc Donnell, P., Buske, M. B., Deen, K. C., Zyn, S., Silverman, C., Due, E., Appelbaum E. R., Eichman, C., Di Prinzio, R., Doods R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., Young, P. R., 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273:14363-14367.
- 71 Pan, G., Ni, J., Wie, Y. F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V. M. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-818.
- 72 Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skunbatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurnay A, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A.1997. A novel receptor for Apo 2L/ TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*,7, 1003-1006
- 73 Marini, P., Belka, C. 2003. Death receptor ligands: new strategies for combined treatment with ionizing radiation. *Curr.Med. Chem. Anti-Cancer agents* 3:1-10.
- 74 Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth M, Okumusak.2004. TRAIL and its receptors as Targets for cancer therapy. *Cancer Si* 95: 777-783
- 75 Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L. et al. 2001. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR 5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat. Med.* 7: 954-960.

-
- 76 Chuntharapai, A., Dodge, K., Grimmer, K. et al. 2001. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J. Immunol.* 160:4891-4898.
- 77 Younes, A., Vose, J., Zelenek, A. D., Czuczman, M. S. et al. 2005. Results of a Phase 2 trial of HGS-ETR 1 in subjects with relapsed refractory non-Hodgkin's lymphoma. 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology.
- 78 Kanzler, S., Trarbach, T., Heinemann, V., Köhne, C. H., Seeber, S. et al. 2005. Results of a Phase 2 trial of HGS-ETR 1 in subjects with relapsed or refractory colorectal cancer. ECCO 13- the European Cancer Conference.
- 79 Bonomi, P., Greco, F. A., et al. 2005. Results of a Phase 2 trial of HGS-ETR 1 in subjects with relapsed/recurrent non-small cell lung cancer. 11th World Conference on Lung Cancer. July 4, 2005. Abstract. 1851.
- 80 Griffith TS, Rauch CT, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Lynch DH, Smith CA, Goodwin RG, Kubin MZ. 1999. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol* 162 (5): 2597-605
- 81 Luciano, F., Ricci, J. E., Herrant, M., Bertolotto, C., Mari, B., Couscri, J. L., Auberger, P., Tand, B. 2002. Leukemic cells exhibit different requirements for cell death: correlation between caspase activation, DFF 40 / DFF 45 expression, DNA fragmentation and apoptosis in T cell - lines but not in Burkitt lymphoma. *Leukemia.* 16(4):700-707.
- 82 Evdokiou, A., Bouralexis, S., Atkins G. J. et al. 2002. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells but not normal human bone cells to Apo 2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* 99: 491-504.
- 83 Petak, J., Douglas, L., Tillman, M. D., et al. 2001. Pediatric rhabdomyosarcoma cell lines are resistant to Fas-induced apoptosis and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 7 (2):350-357.
- 84 Nimmanapalli, R., Porosnicu, M., Nguyen, D. et al. 2001. Co-treatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha (TRAIL or Apo-2L-) induced apoptosis of Bcr- Abl – positive human acute leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* 7 (2): 350-357.
- 85 Irmeler, M., Theme, M., Hahne, M. et al. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.

- 86 Wang, J., Zobito, A. A., Shen, F. et al. 2000. Inhibition of FAS-mediated apoptosis by the B-cell antigen receptor through C-FLIP. *Eur. Immunol.* 30 (1):155-163.
- 87 Zhang, X. D., Zhang, X. Y., Gray, C. P., Nguyen, T., Hersey, P. 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis - inducing ligand-induced apoptosis is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res.* 61: 7339-7348.
- 88 Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulahi, V., Anderson, K. C., Treon, S.P. 2002. Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* 99:2162-2171.
- 89 Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Bornhart, B. C., Yaish-Ohad, S., et al. 2002. C-FLIP (L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD 95 mediated apoptosis. *EMBO J.* 21:3704-3714.
- 90 Beresford, S. A., Davies, M. A., Gallick, G. E., Donato, N. J. 2001. Differential effects of phosphatidylinositol - 3 / Akt / - kinase inhibition on apoptotic sensitization to cytokines in LNCaP and PLC - 3 prostate cancer cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 21:313-322.
- 91 Nesterov, A., Zu, X., Johnson, M., Miller, G.J., Ivashchenko, Y. , Kraft, A. S. 2001. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL- induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:10767-10774.
- 92 Guo, B. C., Xu, Y. H. 2001. Anti-human hepatocellular carcinoma effects of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* 22:831-836.
- 93 Trauzold, A., Wermann, H., Arlt., et al. 2001. CD 95 and TRAIL mediated activation of protein kinase C and NF-kappa B contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 20:4258-4269.
- 94 Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., et al. 1998. Two CD 95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
- 95 Keogh, S. A., Walczak, H., Bouchier-Hayes, L., Martin, S. J., 2000. Failure of Bcl.2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 471(1):93-98.

-
- 96 Belka, C., Betsch, A., Marini, P., Jendrossek, V., Bamberg, M., Budach, W. 2003. Zelltodliganden in Kombination mit ionisierender Strahlung. Rationale und Kenntnisstand. *Strahlenther. Onkol.* 141-151.
- 97 Wendt, J., von Haefen, C., Belka, C., Dörken, B., Daniel, P. T. 2005. TRAIL sensitizes for
- 98 Ionising irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax dependent mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 24(25):4052-4064.
- 99 Rudner, J., Jendrossek, V., Lauber, K., Daniel, P. T., Wesselborg, S., Belka, C. 2005. Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis-results from dose-response studies. *Oncogene* 24(1): 130-140.
- 100 Hamasu, T., Inanami, O., Asenuma, T., Kuwabasa, M. 2005. Enhanced induction of apoptosis by combined treatment of human carcinoma cell with X-rays and death receptor agonists. *J. Radiat. Res.* 46(1):103-110.
- 101 Marini, P., Schmid, A., Jendrossek, V., Faltin, H., Daniel, P. T., Budach, W., Belka, C. 2005. Irradiation specifically sensitizes solid tumor cell lines to TRAIL-mediated apoptosis. *BMC Cancer* 5:1471-2407.
- 102 Broadus, V. C., Bansen, T. B., Abayasiriwardana, K. S., Wilson, S. M., Finch, A. J., Swigart, L. B., Hunt, A. E., Evan, G. 2002. Bid mediates synergy between TNF-related apoptosis-inducing ligand and DNA damage. *J. Biol. Chem.*: 0021-9258.
- 103 Gong, J., Yang, D., Kohanim, S., Humphreys, R., Broemeling, L., Kurzrock, R. 2006. Novel in vivo imaging shows up – regulation of death receptors by paclitaxel and correlates with enhanced antitumor effects of receptor agonist antibodies. *Mol. Cancer, Ther.* 5(12):2991-2300.
- 104 Nagy, K., Szekely-Szűts, K., Jzeradjene, K., Douglas, Z., Tillman, M., Barti-Juhasz, H., Dominici, M., Spano, C., Luca Cervo, G., Conte, P., Houghton, J. A., Mihalik, R., Kopper, L., Petak, I. 2006. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathol. Oncol. Res.* (12):133-142.
- 105 Karihari, C. A., Roy, J., Tryggestad, E., Feldmann, G., Pricilla, C., Welsh, K., Reed, J. C., Armous, E. P., Wong, J., Herman, J., Rakneja, D., Maiha, A. Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancer using small-molecule

- antagonists of the X-linked inhibition of apoptosis protein. *Mol. Cancer Ther.* 6:957-966.
- 106 (HGSI Press Release) Human Genome Sciences initiates randomized phase 2 clinical trial of HGS-ETR 1 in combination with Brotezomib. July 20, 2006.
- 107 Roue, G., Perez-Galan, P., Lopez-Guerra, M., Villamor, N., Campo, E., Colomer, D. 2007. Selective inhibition of I κ B kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J. Immunol.* 178(3):1923-1930.
- 108 Marini, P., Denzinger, S., Schiller, D., Kauder, S., Welz, S., Humphreys, R., Daniel, P.T., Jendrossek, V., Budach, W., Belka, C. 2006. Combined treatment of colorectal tumors with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR 1 and HGS-ETR 2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo. *Oncogene* 1-10.
- 109 Puhae, L., Kanahasaj, P., Humphreys, R., Alderson, R., Bloom, M., Sung, C., Riccobene, T., Johnson, R., Fiscella, M., Mahoney, A., Carrell, J., Boyd, E., Yao, X. T., Zhang, L., Zhong, L., von Kerczek, A., Shepard, L., Vaughan, T., Edwards, B., Dobson, C., Salcedo, T., Albert, V. 2005. HGS-ETR 1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody induces cell death in multiple tumor types in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 92:1430-1441.
- 110 Harihasan, S., Gore, L., Eckhardt, S.G., Cohen, R. B. et al. 2005. A Phase 1 and pharmacological study of HGS – ETR 1, an antibody targeting TRAIL-R 1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies. AACR-NCI-EORTC International Conference in Molecular Therapeutics.
- 111 Mom, C. H., Sleijfer, S., Gietema, J. A. et al. A Phase 1 study of HGS – ETR 1, a fully human antibody to TRAIL-R 1, in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with advanced solid malignancies.
- 112 Marini, P., Stickl, S., Junginger, D., Jendrossek, V., Budach, W., Belka, C. 2007. A colorectal Xenograft model for combined treatment with the agonistic TRAIL-receptor antibody Lexatumuab and fractionated irradiation shows enhanced local tumor control and survival under norm- and hypoxic conditions. 14. internationales Treffen des AEK (Arbeitskreis experimentelle Krebsforschung)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. C. Belka für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dr. P. Marini für die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit, für ihre wertvolle Hilfe und fachkundige Anleitung während der Durchführung, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Des Weiteren danke ich Karim-Maximilian Niyazi für seine Hilfe bei der Auswertung meiner Koloniebildungstests.

Danken möchte ich auch dem Laborteam, insbesondere Heidi Faltin, für die gute Zusammenarbeit während meiner Zeit im Labor, sowie den Mitarbeitern der Radioonkologie, die mir bei der Bedienung der Linearbeschleuniger stets hilfreich zur Seite standen.

Lebenslauf

Name: Stefanie Denzinger
Geburtstag: 22.04.1982
Geburtsort: Stuttgart
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1988 bis 1992 Grundschule in Ditzingen
1992 bis 2001 Gymnasium in der Glemsaue, Ditzingen

Beruflicher Werdegang:

April 2002 Immatrikulation für Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
März 2004 Physikum
Juni 2004 Beginn der Promotionsarbeit in der Klinik für Radioonkologie des Universitätsklinikum Tübingen bei Prof. Dr. C.Belka
Feb.2005 bis April. 2006 Famulaturen: Innere Abteilung des Marienhospitals Stuttgart; Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin des Marienhospitals Stuttgart; Klinik für Radioonkologie, Universitätsklinikum Tübingen; Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité, Berlin
August 2007 Beginn des Praktischen Jahres in Tübingen mit Wahlfach Anaesthesie
04.Dezember 2008 2.Ärztliche Prüfung