

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose beim Ewing-Sarkom durch Caspase-8 Mangel

- Modulation durch IFN- γ -

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2003

Von Ruth Klein

Geboren in Bad Oeynhausen

Dekan	Prof. Dr. med. J. Zentner
1.Gutachter	PD Dr. med. U. Kontny
2.Gutachter	Prof. Dr. med. P. Fisch
Jahr der Promotion	2003

Für A4573, CHP-100, JR, RD-ES, SB, SK-N-MC, TC32, TC71 und 5838, beziehungsweise die Patienten, aus deren Tumoren diese Zelllinien stammen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1 Das Ewing-Sarkom.....	1
1.2 Apoptose.....	2
1.3 Apoptosewege.....	3
1.3.1 Todesrezeptoren.....	3
1.3.1.1 Der TNF/TNF-Rezeptor Signalweg.....	4
1.3.1.2 Der Fas-Ligand/Fas-Signalweg.....	5
1.3.1.3 Der Apo3L/DR3-Signalweg.....	5
1.3.1.4 Der TRAIL-Signalweg.....	5
1.3.1.5 DR6.....	6
1.3.2 Caspasen	6
1.3.3 Die Bcl-2 Familie.....	7
1.3.4 Die IAP-Familie.....	8
1.4 FAS/TRAIL.....	8
1.4.1 Apoptose über den Fas-Signalweg.....	9
1.4.2 Apoptose durch TRAIL.....	10
1.5 IFN-γ.....	11
1.6. Fragestellung dieser Arbeit.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Materialien.....	13
2.1.1 Zelllinien.....	13
2.1.2 Geräte und Reagenzien.....	13
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Zellkulturen.....	15
2.2.2 Durchflußzytometrische Analysen.....	16
2.2.2.1 Apoptosenachweis mittels Durchflußzytometrie.....	16
2.2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse der TRAIL-Rezeptoren.....	16
2.2.3 Gewinnung von RNA und Proteinen.....	17
2.2.4 RT-PCR.....	18
2.2.5 Western Blot.....	19
2.2.6 RNase Protektionsversuch.....	20

3 Ergebnisse.....	22
3.1 Sensitivität von ES Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose.....	22
3.2 Untersuchung der Resistenzursache bei den ES-Zelllinien A4573 und JR.....	23
3.2.1 Durchflußzytometrische Analyse der zelloberflächengebunden Rezeptoren für TRAIL.....	23
3.2.2 Expression von cFLIP bei den 9 ES-Zelllinien im Western Blot.....	25
3.2.3 Expression der mRNA verschiedener apoptoseassoziiierter Proteine im RNase Protektionsversuch.....	25
3.2.3.1 Die Gruppe der Caspasen.....	26
3.2.3.2 Die Bcl-2 Familie.....	28
3.2.3.3 Die Todesrezeptoren.....	30
3.2.3.4 Die IAP-Familie.....	32
3.2.3.5 Zusammenfassung der RNase Protektionsversuch Ergebnisse für die 9 ES Zelllinien.....	33
3.2.4 Expression von Caspase-8 im Western Blot.....	34
3.2.5 Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspase-8 Inhibitor.....	34
3.3 Sensitivität von ES Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose nach IFN-γ Vorbehandlung.....	36
3.4 Untersuchung der Ursache für die Sensibilisierung der ES-Zelllinien A4573 und JR gegenüber TRAIL.....	37
3.4.1 Die Caspase-8 Expression nach IFN- γ Behandlung.....	37
3.4.2 Veränderung anderer apoptoseassoziiierter Proteine durch IFN- γ im RNase Protektionsversuch	42
3.4.2.1 Die Gruppe der Caspasen.....	42
3.4.2.2 Die Bcl-2 Familie.....	45
3.4.2.3 Die IAP-Familie.....	48
3.4.2.4 Zusammenfassung der Veränderungen in der Apoptosekaskade durch IFN- γ	51
3.4.3 Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspase-8 Inhibitor nach Sensibilisierung mit IFN- γ	52

4 Diskussion.....	53
4.1 Zusammenfassung der wesentlichen experimentellen Ergebnisse.....	53
4.2 Wirkung von TRAIL auf ES Zelllinien.....	53
4.3 Resistenzmechanismen.....	53
4.3.1 Regulation der TRAIL Wirkung durch unterschiedliche Expression von TRAIL-Rezeptoren.....	54
4.3.2 Regulation der TRAIL Wirkung durch inhibitorische Zellproteine sowie Mitglieder der Bcl-2 Familie.....	55
4.3.3 Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspasen?.....	56
4.4 Wirkung von IFN-γ auf die neun ES Zelllinien.....	57
4.5 Veränderungen möglicher Resistenzmechanismen durch IFN-γ.....	57
4.5.1 Caspase-8.....	57
4.5.2 Beeinflussung anderer möglicher Resistenzmechanismen durch IFN- γ	58
4.5.2.1 Veränderung der TRAIL-Rezeptorexpression durch IFN- γ	58
4.5.2.2 Veränderung der Expression von inhibitorischen Zellproteinen sowie der Bcl-2 Familie durch IFN- γ	59
4.5.2.3 Veränderung anderer apoptoseassoziiierter Proteine durch IFN- γ	60
4.6 Konkrete Forschungsergebnisse dieser Arbeit.....	61
4.7 Weiterführende Forschungsmöglichkeiten.....	62
4.8 Schlussfolgerung.....	63
5 Zusammenfassung.....	65
6 Literaturverzeichnis.....	66
7 Danksagung.....	82
8 Lebenslauf.....	83

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Apo	A polipoprotein
BSA	B ovines S erumalbumin
CD 99	C luster of D ifferentiation 99, Differenzierungsantigen 99
cFLIP	c ellular FLICE inhibitory p rotein, zelluläres FLICE inhibierendes Protein
CT	C omputertomographie
DcR	D ecoy R ezeptor, Köderrezeptor
DD	D eath D omain, Todesdomäne
DNA	D esoxyribonucleinsäure
DR	D eath R eceptor, Todesrezeptor
EICESS	E uropean I ntergroup C ooperative E wing's S arcoma S tudy G roup
ELISA	E nzyme-linked i mmuno s orbent a ssay, heterogener Enzym-Immunoassay
ES	E wing-Sarkom
ESFT	E wing's S arcoma f amily of t umors
EST	E xpressed S equence T ags
Facs	F luorescence- a ctivated c ell s orter, Durchflusszytometer
FADD	F as a ssociated d eath d omain, Fas assoziierte Todesdomäne
FASL	F as L igand
FITC	F luoreszeinisothiocyanat
FLICE	F ADD like I L-1 β - c onverting e nzyme
fmk	F luoromethyl K eton
GAS	g amma a ctivated s ite
IAP	I nhibitor of A poptosis P roteins
IETD	I le- G lu- T hr- A sp (OMe)
Ig	I mmunglobulin
IRF	I nterferon r egulatory f actor
kB	K ilobasen
kD	K ilodalton
L	L igand
MHC	m ajor h istocompatibility c omplex
MIC2	Synonym für CD99, M onoclonal ; I mperial C ancer R esearch ; 2 =order of discovery, Reihenfolge der Entdeckung

mRNA	m essenger R ibonucleinsäure
MRT	M agnetresonanztomographie
NK	N atürliche K illerzellen
PBS	P hosphate B uffered S aline
PPNET	P eripheral p rimitive n euroectodermal t umor
rhIFN- γ	r ecombinant h uman I nterferon γ
RIP	R eceptor i nteracting p rotein
SDS	S odium d odecylsulfat
Stat	S ignal t ransducers and a ctivators of t ranscription
TNF	T umor N ekrosefaktor
TNF-R	T umor N ekrosefaktor R ezeptor
TRADD	T NF- R a ssociated d eath d omain, TNF-R assoziierte Todesdomäne
TRAIL	T NF- r elated a ptosis i nducing l igand
TRAIL-R	TRAIL- R ezeptor
TRPM-2	T estosterone r epressed p rostate m essage 2
UTP	U ridin t riphosphat
VAD	Val-Ala-Asp (OMe)
Z	benzyloxycarbonyl

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Das Ewing-Sarkom

Das Ewing-Sarkom ist der zweithäufigste Knochentumor bei Kindern und Jugendlichen (Paulussen u. Jürgens 2000). Es wurde erstmals 1921 von James Ewing als rundzelliger Tumor der Diaphysen langer Röhrenknochen beschrieben, der im Gegensatz zum Osteosarkom strahlensensibel ist (Ewing 1921).

Heute wird das Ewing-Sarkom gemeinsam mit den peripheren primitiven neuroektodermalen Tumoren (PPNET) zur Ewing-Sarkom Familie von Tumoren (ESFT) gerechnet (Horowitz et al. 1997). Gemeinsame Merkmale dieser Gruppe von Tumoren sind zum einen die starke Expression des CD99/MIC2-Gens und zum anderen das Vorhandensein einer charakteristischen Translokation zwischen dem EWS-Gen und einem Mitglied der ets-Familie von Transkriptionsfaktoren (Delattre et al. 1992, Kovar 1998).

Bis Mitte der 80er Jahre herrschte die damals von James Ewing vertretene Meinung vor, dass das Ewing-Sarkom endothelialen Ursprungs ist. Heute geht man davon aus, dass es aus postganglionären parasymphatischen Primordialzellen entsteht, die überall im parasymphatischen Nervensystem vorkommen und demzufolge neuronalen Ursprungs ist (Horowitz et al. 1997).

Das Ewing-Sarkom hat eine Inzidenz von 0,3/100.000 Kinder und zählt damit zu den selteneren Tumoren (Paulussen u. Jürgens 2000). Es tritt gehäuft im zweiten Lebensjahrzehnt auf. Nur Einzelfälle werden bei über 30-jährigen beschrieben.

Statistischen Erhebungen aus den USA zufolge gehören 96% der Betroffenen der weißen, nur 1,8% der schwarzen und schließlich 2,2% allen anderen Rassen an (Horowitz et al. 1997).

Bis in die frühen 60er Jahre setzte man in der Behandlung des Ewing-Sarkoms auf lokale Bestrahlung und Chirurgie. Zu diesem Zeitpunkt überlebten nur 10% der Patienten 5 Jahre. Mit der Einführung der systemischen Chemotherapie verbesserten sich die Überlebenschancen der Betroffenen immens.

Begonnen wurde Anfang der 60er Jahre mit den Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Actinomycin-D und Vincristin. In den 70er Jahren ergänzte man Adriamycin und zu Beginn der 90er Ifosfamid und Etoposid zum Behandlungsprotokoll (Horowitz et al. 1997).

Gemeinsam mit technischen Verbesserungen auf den Gebieten der Diagnostik (Einführung von CT und MRT), der Chirurgie und der Bestrahlungstherapie erreichte man so eine 5-Jahre-rezidivfreie-Überlebensrate von 61,3% für Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt keine nachweisbaren Metastasen hatten, und 29% für Patienten mit Metastasen (EICESS) (Cotterill et al. 2000).

Die Prognose dieses Tumors ist gerade im Hinblick auf das betroffene Patientenkollektiv trotz optimaler Nutzung der im Augenblick verfügbaren Maßnahmen immer noch äußerst unbefriedigend.

Damit gehört das Ewing-Sarkom zu den Tumorerkrankungen, die die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten besonders dringlich erscheinen lassen.

1.2 Apoptose

Vorangetrieben wurde die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten für maligne Erkrankungen durch die Erkenntnisse, die in den letzten Jahren über Wachstumsregulation, Stressantwort der Zelle und den Wirkungsmechanismus von zytotoxischen Therapeutika gewonnen wurden.

So konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Chemotherapeutika über Stress, den sie der Zelle auf verschiedene Arten zufügen, letztlich den intrazellulären Apoptoseprozess aktivieren (Kerr et al. 1994, Hannun 1997).

Der Begriff Apoptose (gr.: das Abfallen von Laub) wurde erstmals zu Beginn der 70er Jahre von Wyllie und Kerr geprägt (Kerr et al. 1972).

Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich um die physiologische Form des Zelluntergangs, der für die Entwicklung von Lebewesen und die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase unerlässlich ist. Die Apoptose lässt sich von der Nekrose sowohl durch ihre Auslöser, als auch durch ihr morphologisches Erscheinungsbild abgrenzen.

Morphologisch wird die Apoptose charakterisiert durch Chromatinkondensation, intrazytoplasmatische Granula, Zytoplasmakondensation, den Zerfall der DNA und die Formierung von apoptotischen Körperchen, die von umgebenden Zellen phagozytiert werden (Kerr et al. 1972, Wyllie et al. 1980).

Eine Reihe von Apoptoseauslösern sind bereits identifiziert worden. Dazu gehören neben den bereits erwähnten Chemotherapeutika, die radioaktive Bestrahlung, Hyperthermie, Hormonentzug oder zusätzliche Hormongabe, zytotoxische Lymphozyten und eine Gruppe von Liganden, die durch Bindung an sogenannte „Todesrezeptoren“, die auf der Zelloberfläche vorhanden sind, die apoptotische Maschinerie der Zelle aktivieren können (Kerr et al. 1994, Hannun 1997).

In dieser Arbeit steht die Auslösung von Apoptose durch diese Liganden und ihre Rezeptoren im Mittelpunkt. Man erhofft sich, dass eine Therapie, die spezifisch die „Todesrezeptoren“ angreift, im Vergleich zur bisher üblichen Chemotherapie effizienter ist.

Effizienz bedeutet in diesem Zusammenhang die Nebenwirkungen zu reduzieren, die dadurch entstehen, dass die konventionelle Therapie die Apoptosemaschinerie der Zelle über eine Zellstrukturverletzung/Stress aktiviert. Im Gegensatz dazu wäre der Weg über Liganden/Rezeptorinteraktion direkter und damit effektiver.

1.3 Apoptosewege

Einen Überblick über die, mit den „Todesrezeptoren“ in Zusammenhang stehende, Apoptosemaschinerie liefert die folgende Abbildung (Abb. 1.1). Die Bedeutung der einzelnen Bestandteile wird - untergliedert in Todesrezeptoren, Caspasen, Bcl-2 Familie und IAP-Familie - im folgenden Text erläutert.

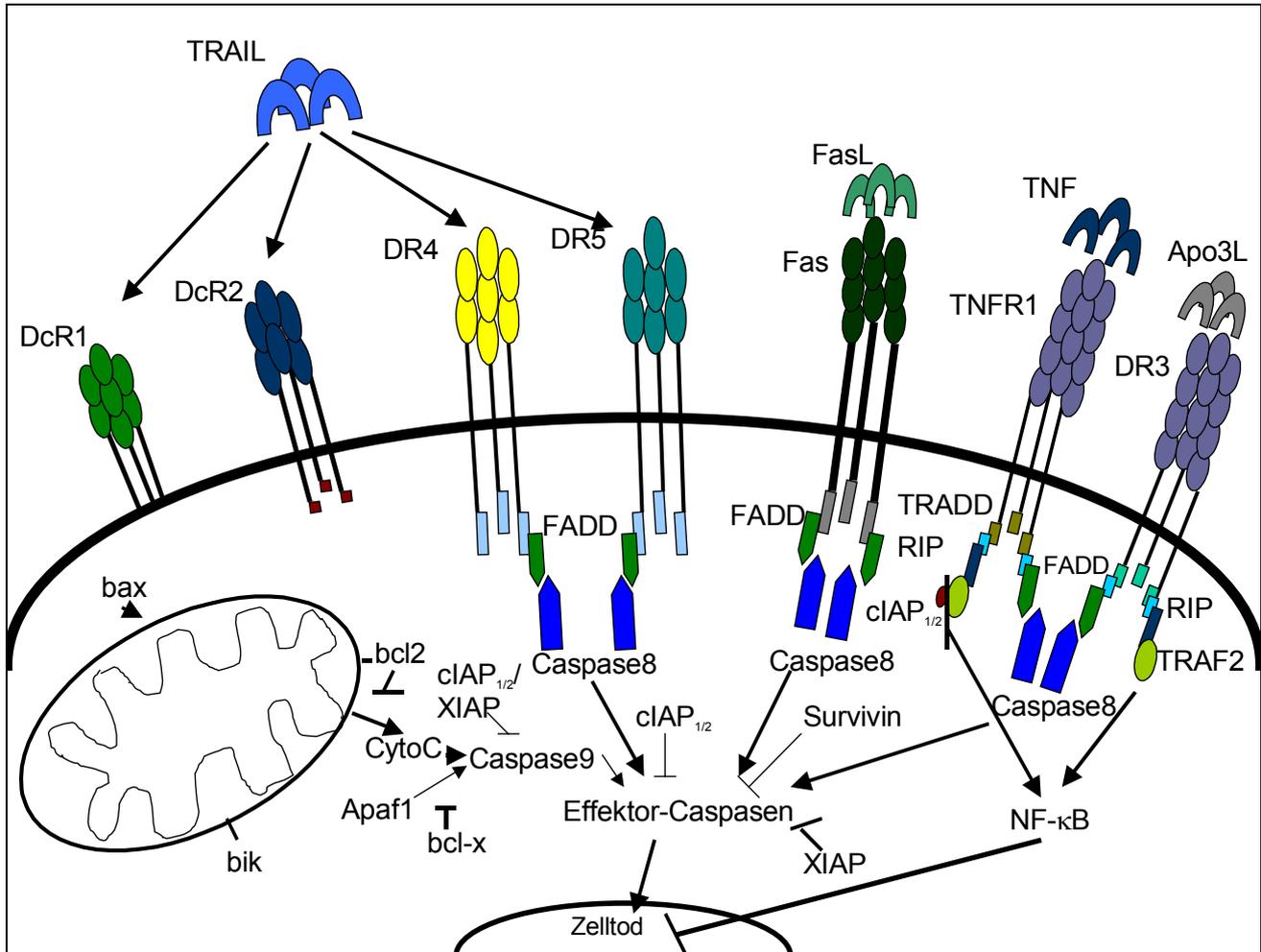


Abb. 1.1: Überblick über die mit den Todesrezeptoren in Zusammenhang stehenden Apoptosewege

1.3.1 Todesrezeptoren

Todesrezeptoren sind Zelloberflächenrezeptoren und gehören zur Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie (TNFR-Familie). Im Einzelnen heißen sie TNFR1 (p55/CD120a), Fas (Apo1/CD95), DR3 (WSL1/Apo3/LARD/TRAMP), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (Apo2/TRAIL-R2/TRICK2/KILLER) und DR6 (hier nicht abgebildet).

Sie zeichnen sich zum einen durch die Homologie ihrer cysteinreichen extrazellulären Domäne (Smith et al. 1994, Gruss u. Dower 1995) und zum anderen durch eine zyttoplasmatische Todesdomäne (Death Domain=DD) aus (Tartaglia et al. 1993, Nagata 1997). Die Todesdomäne ist

über Proteininteraktion mit sogenannten Adapterproteinen für die weitere Todessignalvermittlung essentiell.

Alle diese Rezeptoren sind membrandurchspannende Typ I-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, das heißt sie besitzen eine Signalsequenz sowie zwei cysteinreiche Regionen am extrazellulären NH₂-terminalen Ende und eine transmembranäre Region in der Molekülmitte (Nagata 1997). Über Bindung ihrer spezifischen Liganden, die zur TNF-Liganden-Familie gehören, sind sie in der Lage, mit Hilfe der erwähnten Todesdomäne, das Todessignal nach intrazellulär zu übermitteln. Hinsichtlich des Signalwegs gibt es allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Todesrezeptoren.

Die Liganden sind Typ II-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die zelloberflächengebunden vorkommen, aber durch Proteolyse mittels einer Metalloproteinase (Gearing et al. 1994, Tanaka et al. 1996, Kashii et al. 1999) abgespalten werden können und somit auch in löslicher Form vorliegen (Nagata 1997).

Sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Variante dieser Proteine muss, so konnte für TNF und FasL gezeigt werden, um aktiv zu sein, in einer trimerisierten Form vorliegen (Tanaka et al. 1997).

1.3.1.1 Der TNF/TNF-Rezeptor Signalweg

TNFR1 (p55/CD120a) wurde erstmals 1975 beschrieben (Carswell et al. 1975). Über Bindung seines Liganden ist dieser Rezeptor prinzipiell in der Lage, zwei verschiedene Signalwege zu aktivieren. Ein Weg führt über Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und JNK/AP1 zur Induktion von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Genen (Tartaglia u. Goeddel 1992), ein weiterer zur Auslösung von Apoptose. Allerdings wird über diesen Rezeptor nur dann Apoptose vermittelt, wenn die Proteinsynthese blockiert ist.

TNF bindet als Trimer an drei TNFR1 Moleküle. Daraus folgt die Rekrutierung des Adapterproteins TRADD (TNF-R associated death domain) an die intrazytoplasmatische Todesdomäne von TNFR1. TRADD kann nun entweder über Bindung von TRAF2 (TNF-R associated factor 2) und RIP (receptor interacting protein) zur Aktivierung von NF- κ B und JNK/AP1 führen und so die Transkription im Zellkern aktivieren (Malinin et al. 1997, DiDonato et al. 1997) oder über Rekrutierung von FADD, wie bei Fas beschrieben, Caspase-8 aktivieren und damit zur Apoptose führen (Hsu et al. 1996, Chinnaiyan et al. 1996a).

1.3.1.2 Der Fas-Ligand/Fas Signalweg

Der bisher am intensivsten erforschte Todesrezeptor ist Fas (Apo1/CD95), der erstmals 1989 beschrieben wurde (Trauth et al. 1989, Yonehara et al. 1989). Dieser Rezeptor ist ubiquitär exprimiert, vor allem in Thymus, Herz, Leber und Nierengewebe (Nagata 1997).

An diesen Todesrezeptor bindet FasL (CD95L/Apo1L), ein zur TNF-Ligandenfamilie gehörendes Protein. Da es in trimerisierter Form vorliegt, bindet es jeweils drei Fas Moleküle (Smith et al. 1994, Nagata 1997). Als Folge der Rezeptor-Liganden Interaktion wird ein Adapterprotein, FADD (Fas-associated death domain/MORT1), an die aggregierten zytoplasmatischen Todesdomänen von Fas rekrutiert. FADD verfügt über eine Todeseffektordomäne, die über Bindung und Spaltung von ProCaspase-8 (FLICE/MACH) (Boldin et al. 1996) zur Aktivierung der Caspasenkaskade führt, welche in Abschnitt 1.3.2 näher beschrieben ist. Ergebnis dieser Kaskade ist der Zelltod.

1.3.1.3 Der Apo3L/DR3 Signalweg

Der Todesrezeptor DR3 (Death Receptor 3, WSL1, Apo3, LARD, TRAMP) zeigt die größte Ähnlichkeit im Vergleich zu TNFR1 (Chinnaiyan et al. 1996b, Marsters et al. 1996, Kitson et al. 1996, Bodmer et al. 1997, Screaton et al. 1997a). Der zugehörige Ligand ist Apo3L, der wiederum TNF sehr ähnlich ist (Marsters et al. 1998). Wie bei TNFR1 besteht auch bei DR3 grundsätzlich die Möglichkeit, entweder über TRADD, RIP und TRAF2 NF- κ B und JNK/AP1 zu aktivieren, oder über FADD und Caspase-8 Apoptose zu vermitteln. Der Unterschied zwischen den beiden Rezeptoren/Liganden besteht allerdings in ihrem Expressionsmuster. So wird TNF hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten exprimiert (Tartaglia u. Goeddel 1992) und Apo3L von verschiedensten Geweben (Chicheportiche et al. 1997, Marsters et al. 1998). Im Gegensatz dazu kommt TNFR1 ubiquitär vor (Tartaglia u. Goeddel 1992) und DR3 hauptsächlich in Milz, Thymus und peripheren Blutzellen (Chinnaiyan et al. 1996b, Marsters et al. 1996, Kitson et al. 1996, Bodmer et al. 1997, Screaton et al. 1997a). Es muss also davon ausgegangen werden, dass trotz ihres gemeinsamen Signalweges, beide Rezeptoren über unterschiedliche physiologische Funktionen verfügen.

1.3.1.4 Der TRAIL-Signalweg

1995 wurde TRAIL (Apo2L) als ein neues Mitglied der TNF Familie erstmals beschrieben (Wiley et al. 1995, Pitti et al. 1996). Dazu suchte man in DNA Datenbanken nach „Expressed Sequence Tags“ (EST), die Ähnlichkeit mit FasL/TNF besitzen, um weitere Proteine zu finden, die in der Apoptoseregulation eine Rolle spielen. Die größte Ähnlichkeit besitzt TRAIL zu FasL mit einer Homologie von 28% (Wiley et al. 1995).

In der Folge sind für TRAIL fünf verschiedene Rezeptoren identifiziert worden. Zum einen gehören dazu zwei weitere Todesrezeptoren DR4 (TRAIL-R1) (Pan et al. 1997) und DR5 (TRAIL-R2/Apo2/TRICK2/KILLER) (Pan et al. 1997, Sheridan et al. 1997, Walczak et al. 1997, Screaton et al. 1997b, Wu et al. 1997), und zum anderen zwei sogenannte Decoy Rezeptoren DcR1 (TRID/TRAIL-R3/LIT) und DcR2 (TRAIL-R4/TRUNDD) (Sheridan et al. 1997, Degli-Esposti et al. 1997a, Degli-Esposti et al. 1997b) sowie ein löslicher Rezeptor OPG (Osteoprotegerin) (Emery et al. 1998).

DcR1 ähnelt DR4 und DR5, verfügt aber über keine zytoplasmatische Domäne. DcR2 dagegen besitzt eine verkürzte zytoplasmatische Domäne und ist *in vitro* in der Lage, NF- κ B zu aktivieren (Degli-Esposti et al. 1997b), kann aber wie DcR1 ebenfalls nicht Apoptose vermitteln.

Osteoprotegerin scheint über kompetitive Inhibition der Bindung von TRAIL an DR4 und DR5 die TRAIL-vermittelte Apoptose zu blockieren (Emery et al. 1998).

DR4 und DR5 besitzen als Mitglieder der Todesrezeptorengruppe beide eine zytoplasmatische Todesdomäne. Lange bestand Unklarheit hinsichtlich des intrazellulären Signalwegs, den diese beiden Rezeptoren für die Apoptoseauslösung nutzen. Vor kurzem konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass DR4 und DR5 ähnlich wie Fas ihr Todessignal über die Rekrutierung von FADD und Caspase-8 vermitteln (Kuang et al. 2000, Kischkel et al. 2000, Sprick et al. 2000). Zudem sind beide Rezeptoren nach Caspaseninhibition in der Lage, den NF- κ B/JNK Weg zu aktivieren (Mühlenbeck et al. 2000).

1.3.1.5 DR6

1998 wurde die Gruppe der Todesrezeptoren durch den neuen Rezeptor DR6 ergänzt (Pan et al. 1998). DR6 wird in den meisten menschlichen Geweben exprimiert, vor allem in Herz, Gehirn, Plazenta, Pankreas, Thymus und Lymphknoten, sowie in verschiedenen Tumorzelllinien.

Wie TNFR1, so interagiert auch DR6 über seine Todesdomäne zunächst mit TRADD (TNFR associated death domain). Über diesen Rezeptor können ebenfalls entweder der NF- κ B und JNK/AP1-Weg oder Apoptose ausgelöst werden. Die genaue physiologische Funktion dieses neuen Rezeptors, sowie sein Ligand, sind bisher nicht bekannt.

1.3.2 Caspasen

Bei den Caspasen handelt es sich um die zentrale Komponente im Apoptoseapparat der Zelle.

Während der Erforschung von Apoptose bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurde ein Gen entdeckt, *ced-3*, das unerlässlich für den Apoptoseprozess im Rahmen der Individualentwicklung dieses Organismus ist (Yuan et al. 1993). Dieses Gen besitzt Ähnlichkeit mit

der Cystein Protease Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE) (Yuan et al. 1993) bei Säugetieren, was zur Entdeckung der Caspasen-Familie führte, zu der inzwischen über 12 Mitglieder gehören.

Bei den Caspasen, einer Gruppe von Cystein Proteasen, handelt es sich um Enzyme, die ein proapoptotisches Signal aufnehmen und über eine Kaskade aktiv den Zerfall der Zelle herbeiführen. Diese Enzyme kommen als Proenzyme (30-50 kD) vor, die aus drei Untereinheiten bestehen. Dazu gehören eine NH₂-terminale Domäne, eine große (20 kD) und eine kleine (10 kD) Untereinheit. Wenn diese Proenzyme aktiviert werden, erfolgt eine Spaltung zwischen ihren Untereinheiten und es formieren sich die große und kleine Untereinheit neu zu einem Heterodimer. Als aktive Form bilden jeweils zwei Heterodimere ein Tetramer und haben dann zwei katalytisch aktive Regionen (Thornberry u. Lazebnik 1998).

Die Gruppe der Caspasen wird unterteilt in zwei Unterfamilien. Eine Unterfamilie wird von den Initiatorcaspasen gebildet, zu denen die Caspasen-8, -9 und -10 gehören, die proapoptotische Signale aufnehmen und an Effektorcaspasen weiterleiten. Die zweite Subfamilie wiederum umfasst die Effektorcaspasen, zu denen die Caspasen -3, -6 und -7 gehören, die dann aktiv den Zerfall der Zelle einleiten.

Den Zerfall der Zelle bewirken die Caspasen über verschiedene Mechanismen. Sie inaktivieren Proteine, die lebende Zellen vor Apoptose schützen (Enari et al. 1998, Liu et al. 1997), sie zerstören Strukturproteine (Takahashi et al. 1996, Orth et al. 1996) und inaktivieren Reparaturmechanismen der Zelle (Cryns u. Yuan 1998, Rheaume et al. 1997).

1.3.3 Die Bcl-2 Familie

Bei der Bcl-2 Familie handelt es sich um eine Gruppe von mindestens 15 zytoplasmatischen, mitochondrienassoziierten Proteinen, die ebenfalls eine wichtige Funktion innerhalb des Apoptoseprozesses von Zellen haben (Cory et al. 1995, Strasser et al. 1997, Yang u. Korsmeyer 1996, Chao u. Korsmeyer 1998).

Diese Familie wird in zwei Unterfamilien aufgeteilt. Zum einen gibt es die anti-apoptotische Unterfamilie, deren Mitglieder die größte Ähnlichkeit mit Bcl-2 haben. Zu ihr gehören neben Bcl-2 auch Bcl-x_L, Bfl-1, Bcl-w und Mcl-1. Zum anderen gibt es die pro-apoptotische Unterfamilie, die Bax, Bak, Bik, Blk, Bad, Bid und Bok umfasst (Adams u. Cory 1998). Kennzeichnend ist, dass alle Mitglieder eine der vier Domänen besitzen, die von Bcl-2 bekannt sind (BH1-BH4).

Die Expression der einzelnen Mitglieder der Bcl-2 Familie wird über Zytokine, sowie andere Todes- und Überlebenssignale reguliert (Adams u. Cory 1998). Sowohl pro- als auch anti-apoptotische Mitglieder dieser Familie können heterodimerisieren und sich so gegenseitig in ihrer Funktion titrieren (Oltvai et al. 1993). Welches Signal also letztlich von dieser Proteinfamilie in

Bezug auf Apoptoseauslösung ausgeht, hängt damit von dem Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Mitgliedern ab.

Über den genauen Mechanismus, über den die Bcl-2 Familie in die Apoptosesignalvermittlung eingreift, sind bisher nur Einzelheiten bekannt. So wird während der Apoptose durch UV-Bestrahlung, Bax-Überexpression, Staurosporin oder FasL aus Mitochondrien Cytochrom C freigesetzt. Diese Freisetzung lässt sich durch Bcl-2 inhibieren (Yang et al. 1997). Cytochrom C wiederum ist ein wichtiger Bestandteil des „Apoptosomes“ bestehend aus Cytochrom C, Apaf1 und Procaspase-9 (Li et al. 1997), welches zur Aktivierung von Caspase-9 und damit zum Zelluntergang führen kann. Diese Procaspase-9-Aktivierung durch Cytochrom C kann durch Bcl-x blockiert werden (Adams u. Cory 1998).

1.3.4 Die IAP-Familie

Bei der IAP(Inhibitor of Apoptosis)-Familie handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die gekennzeichnet ist durch die BIR (baculovirus IAP repeat) Region in ihrer Aminosäuresequenz (Crook et al. 1993, Birnbaum et al. 1994). Die Mitglieder dieser Familie sind in der Lage, sowohl die Prozessierung, als auch die Aktivierung von Caspasen zu inhibieren.

Beim Menschen sind fünf verschiedene IAPs beschrieben XIAP (hILP), c-IAP-1 (HIAP2), c-IAP-2 (HIAP1), NAIP und Survivin. XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 binden die Effektorcaspasen-3 und -7, sowie die Initiatorcaspase-9 und verhindern damit die Induktion der Apoptosekaskade (Deveraux et al. 1997, Deveraux et al. 1998, Deveraux et al. 1999, Roy et al. 1997).

Survivin ist zum einen ebenfalls in der Lage, an die Effektorcaspasen -3 und -7 zu binden und diese direkt zu inhibieren (Tamm et al. 1998, Shin et al. 2001b). Zum anderen bindet es an die Mikrotubuli von Mitosespindeln in der G₂/M-Phase des Zellzyklus, wodurch diese stabilisiert werden und Apoptose direkt verhindert wird (Li et al. 1998). Survivin ist deshalb interessant, da verschiedene Arbeitsgruppen eine Korrelation zwischen der Survivinexpression eines Tumors und der Prognose beschrieben haben (Grossmann et al. 1999, Sarela et al. 2000). So ließ sich zum Beispiel für das Melanom zeigen, dass die verstärkte Expression von Survivin in Zellen dieses Tumors mit einer ungünstigen Prognose einhergeht (Grossmann et al. 1999).

Für NAIP konnte ebenfalls in verschiedenen Zellsystemen eine anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden; der Mechanismus ist allerdings noch nicht endgültig aufgedeckt.

1.4 Fas/TRAIL

Die Vorstellung, dass es einen Tumor-nekrotisierenden Faktor geben müsste, ist Ende des 19. Jahrhunderts durch den New Yorker Chirurgen Coley aufgekommen, der beobachtet hatte, dass es

in der Folge von bakteriellen Infektionen bei Krebspatienten zu einer spontanen Regression der Tumorerkrankung kam (Old 1985).

Circa ein Jahrhundert später entdeckte man TNF als einen zirkulierenden Faktor, der zum einen durch bakterielle Infektion induzierbar war und zum anderen im Mausversuch eine deutliche Wirkung auf Tumoren zeigte (Carswell et al. 1975). Die systemische Gabe von TNF wurde jedoch aufgrund von schweren Nebenwirkungen nicht weiter in Erwägung gezogen (Havell et al. 1988, Brouckaert et al. 1986).

Ein weiterer Grund, warum auf der Suche nach einem therapeutisch geeigneten Todesrezeptor-Signalweg TNF und auch DR3 eher im Hintergrund stehen, ist, dass über diese beiden Rezeptoren, wie in 1.3.1.1 und 1.3.1.3 beschrieben, eher ein antiapoptotischer Signalweg intrazellulär vermittelt wird.

Aus diesem Grund konzentrierte man sich zunächst auf FasL und inzwischen sehr intensiv auf TRAIL, in der Hoffnung, einen Todesliganden zu finden, der therapeutisch nutzbar sein könnte.

1.4.1 Apoptose über den Fas-Signalweg

Der Todesrezeptor Fas (Apo1/CD95), der erstmals 1989 von zwei unabhängigen Forschergruppen als neues Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie beschrieben wurde, konnte in vielen Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden. Dazu gehören vor allem Leber, Herz, Lunge, Niere und Ovar (Nagata u. Golstein 1995). FasL wird vor allem auf aktivierten T-Zellen, sowie immunprivilegierten Regionen exprimiert. Die physiologische Rolle von Fas wurde durch spontane Mutationen des Fas Rezeptors (*lpr*) beziehungsweise des Fas Liganden (*gld*) bei Mäusen (Watanabe-Fukunaga et al. 1992, Lynch u. Adachi 1993, Takahashi et al. 1994) sowie beim Menschen (Fisher et al. 1995, Rieux-Lancat et al. 1995) deutlich, die zu einer Lymphadenopathie beziehungsweise zu der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führen (Cohen u. Eisenberg 1991).

Da für Fas nur ein weitervermittelnder Signalweg, nämlich über FADD und Caspase-8 gezeigt werden konnte, scheint Apoptoseinduktion über Fas ein effektiverer Weg zu sein als über TNF. Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, konnte gutes Ansprechen von verschiedenen Tumoren auf anti-Fas-AK beschrieben werden (Trauth et al. 1989, Yonehara et al. 1989).

Getrübt wurde die Hoffnung, die man in Fas setzte durch die Entdeckung, dass Fas auch auf Hepatozyten exprimiert wird und die therapeutische Applikation von anti-Fas-AK so in Hepatozyten Apoptose auslöst. Dies führt bei Mäusen zum Tod durch fulminantes Leberversagen (Ogasawara et al. 1993).

1.4.2 Apoptose durch TRAIL

Seit 1995 ist TRAIL als Mitglied der TNF-Ligandenfamilie bekannt. Auffällig ist, dass TRAIL zwar in einer Reihe maligner Zellen Apoptose induzieren kann, sich allerdings gesundes Gewebe als weitestgehend resistent erweist (Marsters et al. 1996, Wiley et al. 1995, Walczak et al. 1999). Da TRAIL ubiquitär exprimiert ist, vermutete man zunächst, dass der TRAIL-Rezeptor nur auf malignem Gewebe zu finden sein müsste und sich so das selektive Ansprechen auf TRAIL erklären lassen würde.

1997 wurden innerhalb kurzer Zeit vier verschiedene Rezeptoren für TRAIL identifiziert. Zunächst waren es DR4 und DR5, dann DcR1 und DcR2.

Alle vier Rezeptoren zeigen ähnliche Affinität zu TRAIL, allerdings verfügen nur DR4 und DR5 über eine Todesdomäne und können Apoptose auslösen.

Man vermutete zunächst, dass sich gesunde Zellen über die Expression von DcR1 und DcR2, die kompetitiv TRAIL binden, vor der Apoptose-induzierenden Wirkung von TRAIL schützen könnten und Tumorzellen über diese beiden Rezeptoren nicht verfügen würden (Sheridan et al. 1997, Pan et al. 1997).

Allerdings konnte inzwischen gezeigt werden, dass die mRNA der vier TRAIL-Rezeptoren in verschiedensten Geweben exprimiert ist (Griffith u. Lynch 1998, Zhang et al. 1999). Es ließ sich auch keine Korrelation zwischen der Resistenz von gesundem Gewebe, beziehungsweise malignen Zellen gegenüber TRAIL und der TRAIL-Oberflächenrezeptorexpression zeigen (Zhang et al. 1999).

Als weitere mögliche Resistenzursache gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose wird die Überexpression von FLIP (FADD-like IL-1 β -converting enzyme (FLICE) like inhibitory protein) vermutet, eines Proteins, das die Bindung von ProCaspase-8 an FADD kompetitiv inhibiert und dabei nicht katalytisch aktiv ist (Irmeler et al. 1997). Allerdings gibt es auch die Hypothese, dass die TRAIL-Resistenz mit einem noch unbekanntem Mitglied der durch TRAIL-Rezeptorinteraktion aktivierten intrazellulären Apoptosekaskade in Zusammenhang steht.

Aus der Erfahrung mit den anderen TNF Liganden TNF und Fas heraus hat man sich frühzeitig mit der Toxizität von TRAIL befasst. Zunächst zeigte sich eine gute Verträglichkeit von TRAIL im Mausversuch (French u. Tschopp 1999, Walczak et al. 1999, Ashkenazi et al. 1999). Ein *in vitro* Versuch im Jahre 2000 mit menschlichen Hepatozyten allerdings zeigte, dass diese deutlich auf die apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL reagieren, im Gegensatz zu Hepatozyten, die von Maus, Ratte oder Rhesusaffen stammen. Die Schlussfolgerung dieses Experiments war, dass sich der Mensch in diesem Punkt von Maus, Ratte und Rhesusaffen unterscheidet und so Experimente mit diesen Tieren keine Aussagen über die potentielle Toxizität von TRAIL beim Menschen zulassen

(Jo et al. 2000). Relativiert wurde das Ergebnis dieses Versuchs erst durch eine Arbeitsgruppe, die zeigte, dass sich unterschiedliche Versionen von rekombinantem TRAIL wesentlich in ihren biochemischen Eigenschaften und ihrer Toxizität unterscheiden. In dem erwähnten Artikel wurde eine andere Zubereitungsform von TRAIL in zwei Primatenversuchen systemisch gegeben. Eine Toxizität wurde nicht nachgewiesen (Lawrence et al. 2001).

Zu Recht besteht also die Hoffnung, dass man in TRAIL einen Todesliganden gefunden hat, der effektiv Apoptose in malignen Zellen induzieren kann und, da gesundes Gewebe weitgehend verschont bleibt, mit geringen Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung verbunden ist.

Bis dahin ist es allerdings noch ein langer Weg, da über die genaue physiologische Rolle von TRAIL und seinen Rezeptoren, sowie den genauen Signalweg, der über TRAIL vermittelt wird, immer noch wenig bekannt ist.

1.5 IFN- γ

Die Überwindung einer möglichen TRAIL-Resistenz bei den 9 untersuchten ES- Zelllinien soll in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von IFN- γ versucht werden. IFN- γ erhöht die Sensitivität von Tumorzelllinien gegenüber TNF- α und anti-Fas-AK vermittelter Apoptose in noch nicht geklärter Weise (Yonehara et al. 1989, Fransen et al. 1986, Tsujimoto et al. 1986, Brouckaert et al. 1986, Weller et al. 1994). Man vermutet die Regulation einer Reihe von apoptoseassoziierten Faktoren mittels IRF1 (Interferon Regulatory Factor I), eines Transkriptionsfaktors, der IFN-induzierbare Gene aktiviert.

Weiterhin sensitiviert dieses Zytokin virusinfizierte Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose wahrscheinlich über Regulation von TRAIL und TRAIL-Rezeptorexpression (Sedger et al. 1999). Die Wirkung von IFN- γ auf TRAIL-vermittelte Apoptose beim Ewing-Sarkom wurde bisher noch nicht untersucht.

IFN- γ ist, im Gegensatz zu den Typ I Interferonen IFN- α , - β und - ω , ein Typ II Interferon. Erstmals wurde es 1965 aufgrund seiner antiviralen Aktivität entdeckt (Wheelock 1965). Inzwischen ist bekannt, dass IFN- γ auch in der Akute Phase Reaktion, der Komplementkaskade, der Regulation und Expression von MHC-II-Molekülen und der Zellproliferation und Apoptose eine wichtige Rolle spielt.

Produziert wird IFN- γ von T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen (Sedger et al. 1999). Der IFN- γ Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNGR1 und IFNGR2 (Sen u. Ransohoff 1993). Zwei Tyrosinkinase aus der Janus Familie, Jak1 und Jak2, sind mit diesen Untereinheiten verbunden. Wenn IFN- γ an seinen Rezeptor bindet, werden die Tyrosinkinase aktiviert und phosphorylieren IFNGR1, welche damit zur Andockstelle für einen Transkriptionsfaktor Stat1 (Signal Transducers and activators of transcription) wird. Stat1 wird dort

ebenfalls phosphoryliert und in den Zellkern transloziert, wo es über die Bindung von GAS (gamma activated sites) Elementen an den Promotoren von IFN- γ regulierten Genen die Gentranskription beeinflusst. Auch Stat3 und Stat5 werden in Antwort auf IFN- γ Bindung in noch nicht geklärter Weise aktiviert (Platanias u. Fish 1999, Boehm et al. 1997).

Darüberhinaus ist noch ein Mitglied der src Familie von Tyrosinkinase in den IFN- γ Signalweg eingebunden. Fyn interagiert mit der IFN- γ induziert phosphorylierten Form von Jak2. Die Funktion dieser Interaktion ist noch ungeklärt (Boehm et al. 1997). Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die IRFs (Interferon Regulatory Factors) [IRF-1-4] werden als Folge von IFN- γ -Bindung hochreguliert. Diese wirken synergistisch mit IFN- γ in der Transkriptionsaktivierung. Es werden über 200 verschiedene Gene von IFN- γ reguliert, darunter eine Reihe von apoptosefördernden, aber, wie im Falle von NF- κ B, auch eine Reihe von antiapoptotischen Faktoren.

1.6. Fragestellung dieser Arbeit

Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung von TRAIL auf eine Gruppe von Ewing-Sarkom Zelllinien *in vitro* zu untersuchen.

Im Falle von gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose resistenten Zelllinien soll die Ursache für die Resistenz gesucht werden. Dabei geht es vor allem darum, die von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Resistenzmechanismen aus 1.4.2 beim Ewing-Sarkom zu betrachten.

Desweiteren soll die Möglichkeit resistente Ewing-Sarkom Zelllinien mit Hilfe von IFN- γ gegenüber TRAIL zu sensitivieren untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Die Ewing-Sarkom Zelllinien A4573, CHP-100, JR, SK-N-MC, TC32, TC71 und 5838 wurden freundlicherweise von Dr. Jeff Toretsky (University of Maryland, Baltimore, USA) und die Zelllinie SB von Dr. Lee Helmann (Pediatric Oncology Branch, National Institutes of Health, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Die ES Zelllinie RD-ES stammte aus der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

2.1.2 Geräte und Reagenzien

Zellkultur:

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, Kat. Nr. 21875-034, Life Technologies, Karlsruhe

PBS Dulbecco's, Kat. Nr. 14190-094, Life Technologies

Trypsin-EDTA (1X) in HBSS w/ EDTA, Kat. Nr. 25300-054, Life Technologies

Bovines Kälberserum, Sigma Cell Culture, Taufkirchen

Penicillin/Streptomycin-Lösung, Life Technologies

Zellkulturschalen, 100 mm Ø, Polystyrol, Kat. Nr. 353003, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Zellkulturplatten, 96 Vertiefungen, Rundboden, Kat. Nr. 353077, Falcon, Becton Dickinson

Zellkulturflaschen, 50 ml, Kat. Nr. 353108, Falcon, Becton Dickinson

Zellkulturflaschen, 250 ml, Kat. Nr. 353110, Falcon, Becton Dickinson

Water-Jacketed Inkubator, Forma Scientific, Marietta, OH, USA

Durchflusszytometrie:

Rekombinantes humanes IFN- γ , Kat. Nr. 285IF, R+D Systems, Wiesbaden

TRAIL, soluble (human) (recombinant) Kit, Alexis, Grünberg

Caspase-8 Inhibitor, Kat. Nr. FMK007, R+D Systems

PanCaspasen Inhibitor, Kat. Nr. FMK001, R+D Systems

Propidium Iodid, Kat. Nr. P4170, Sigma

Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt

Triton X-100, Kat. Nr. 807426, Schwarz/Mann Biotech, Cleveland, OH, USA

Bovines Serum Albumin, Sigma

Natrium Azid, Kat. Nr. S-8032, Sigma

Rundbodenröhrchen, 5 ml, Polystyrol, Kat. Nr. 352008, Falcon, Becton Dickinson

Ziege-Anti-Maus Ig FITC, Kat. Nr. 349031, Becton Dickinson

Maus IgG1 pur, Kat. Nr. 349040, Becton Dickinson

Maus IgG2a pur, Kat. Nr. 349050, Becton Dickinson

Anti TRAIL-R1-AK (IgG2a), Klon huTRAI-R1-M271, Lot 7136-77, Immunex, Seattle, WA, USA

Anti TRAIL-R2-AK (IgG1), Klon huTRAIL-R2-M413, Lot 7136-88, Immunex

Anti TRAIL-R3-AK (IgG1), Klon huTRAIL-R3-M430, Lot 7136-88, Immunex

Anti TRAIL-R4-AK (IgG1), Klon huTRAIL-R4-M444, Lot 7136-86, Immunex

FACScan, Durchflusszytometer, Seriennummer 82342, Becton Dickinson

DNA-, RNA- und Proteingewinnung:

PeqGOLD TriFast, Kat. Nr. 30-2010, peqLab, Erlangen

Ethanol, Reagenzienzentrale, Universität Freiburg

Chloroform, Merck

Isopropanolol, Merck

SDS, Kat. Nr. 17-1313-01, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Guanidinhydrochlorid, Kat. Nr. G-4505, Sigma

RT-PCR:

Random primer, Kat. Nr. 48190-011, Life Technologies

dATP, Kat. Nr. 10216-018, Life Technologies

dCTP, Kat. Nr. 10217-016, Life Technologies

dGTP, Kat. Nr. 10218-014, Life Technologies

dTTP, Kat. Nr. 10219-012, Life Technologies

DEPC(Diethylen Pyrocarbonat)-behandeltes H₂O

Superscript II, First Strand Puffer, 0,1M DTT, Kat. Nr. 18064-014, Life Technologies

Taq-Polymerase, MgCl₂, 10X PCR-Puffer, Kat. Nr. 18038-042, Life Technologies

Trail-Primer, MWG-Biotech AG, Ebersberg

β-Actin-Primer, MWG-Biotech AG

Agarose, Kat. Nr. 870056, Biozym, Hessisch Oldendorf

100bp DNA-Leiter, Kat. Nr. 15628-050, Life Technologies

TBE-Puffer (10X) (0,9M Tris, 0,9M Borsäure, 40ml 0,5M EDTA pH 8,0 in 1000ml)

Loading-Buffer (Bromphenolblau, Glycerin, EDTA)

Ethidiumbromid-Färbegrad

Western Blots:

BioRad DC Protein Assay, Kat. Nr. 500-0116, BioRad, München

“Mini Protean II Cell”, Serien Nr. 32S/3896, BioRad

“Ready Gel 4-20%” Tris HCL 10 well, 30 µl comb, Kat. Nr. 161-1105, BioRad

Proteinstandard (Full Range Rainbow Marker), Kat. Nr. RPN 800, Amersham Pharmacia Biotech

Nitrozellulose Membran, Kat. Nr. 162-0145, BioRad

Blot Absorbierendes Filter Papier, Kat. Nr. 170-3965, BioRad

Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell, Serien Nr. 221BR2376, BioRad

Monoklonaler anti-β-Aktin AK, Klon AC15, Maus Aszites Flüssigkeit, Sigma

Anti-humaner Caspase-8-AK, Y. Lazebnik, Cold Spring Harbour Laboratories, NY, USA

Anti-humaner cFLIP-AK, Alexis

ECL-Reagenz, Kat. Nr. RPN 2190, Amersham Pharmacia Biotech

RNase Protektionsversuche:

hAPO 1c Multi-Probe Template Set, Kat. Nr. 45607P, PharMingen, Hamburg

hAPO 2c Multi-Probe Template Set, Kat. Nr. 45609P, PharMingen

hAPO 3c Multi-Probe Template Set, Kat. Nr. 45608P, PharMingen

hAPO 5c Multi-Probe Template Set, Kat. Nr. 45613P, PharMingen

RiboQuant InVitro Transcription Kit, Kat. Nr. 45004K, PharMingen

RiboQuant RNase Protektionsversuch Kit, Kat. Nr. 45014K, PharMingen

³²P-UTP, Hartmann-Analytic, Braunschweig

QuickPoint Gelkammer, Kat. Nr. E19700, Novex, Frankfurt am Main

QuickPoint Gele, 16 well, Kat. Nr. QP9731, Novex

QuickPoint Running Buffer (50X), Kat. Nr. QP9732, Novex

QuickPoint Sample Loading Buffer, Kat. Nr. QP9733, Novex

Liquid Scintillation Analyzer, TriCarb, Modell 1900TR, Packard, Torrance, CA, USA

X-OMAT, UV-Film 35x45 cm, Kodak, Stuttgart

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Die Zelllinien wurden, wie im Labor etabliert, in RPMI 1640-Medium mit Zusatz von 10% Fetalem Kälberserum, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle 3-4 Tage erfolgte eine Teilung im Verhältnis 1:5. Dazu

wurden sie mit Hilfe von Trypsin-EDTA aus den Zellkulturflaschen gelöst, zentrifugiert (1.000 x g) und in frischem Medium resuspendiert. Ein Fünftel dieser Zellsuspension wurde dann in eine neue Zellkulturflasche gegeben mit 8 ml (kl.) beziehungsweise 25 ml (gr.) Medium Gesamtinhalt.

2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen

2.2.2.1 Apoptosenachweis mittels Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte mittels einer Propidium Iodid Anfärbung der Kern-DNA. Diese Methode wurde 1991 von Nicoletti et al. erstmals beschrieben (Nicoletti et al. 1991).

Die Ewing-Sarkom Zellen wurden für diesen Versuch in 96-Loch Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Loch kultiviert. Am nächsten Morgen erfolgte dann die Zugabe von Interferon- γ (Endkonzentration: 2.000 IU/ml) und nach weiteren 60 Stunden die Zugabe von TRAIL (Endkonzentration: 200 ng/ml) in Kombination mit dem Enhancer (Endkonzentration: 2 μ g/ml), einem Antikörper, der durch Vernetzung von TRAIL-Molekülen zu einer Aktivitätserhöhung führt. Für die Untersuchung der Apoptose-Inhibition wurden die Zellen 30 Minuten vor Zugabe von TRAIL mit den Caspase-Inhibitoren Z-VAD-fmk (Pan-Caspasen-Inhibitor) oder Z-IETD-fmk (Caspase-8-Inhibitor) inkubiert. Z-VAD-fmk bindet an sämtliche Caspasen und hemmt ihre Funktion; Z-IETD-fmk dagegen hemmt spezifisch die Caspase-8. Nach weiteren 24 Stunden Kultur wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA geerntet und in Falcon Polystyrol Röhrchen bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des entstandenen Zellpellets in 0,4 ml eines hypotonen Puffers (50 μ g/ml Propidium Iodid, 0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100) und die Inkubation über Nacht im dunklen Kühlschrank (4 °C). Die durchflusszytometrische Analyse wurde am FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson) durchgeführt.

Mit Hilfe der roten Propidium Iodid Fluoreszenz lassen sich apoptotische Kerne mit subdiploider DNA von intakten Kernen mit diploider, beziehungsweise im Zellzyklus befindlichen Kernen mit hyperdiploider DNA unterscheiden. Es wurden jeweils 10.000 Zellen ausgewertet und der Anteil subdiploider DNA-Bestandteile nach Abzug der Zelltrümmer ($<10^1$) als Prozentsatz der apoptotischen Zellen gewertet. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest Software, die von Becton Dickinson zum FACScan Durchflusszytometer zur Verfügung steht.

2.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der TRAIL-Rezeptoren

Zur Charakterisierung der Oberflächenrezeptoren wurden jeweils 0,5 Mio. Zellen in Falcon Polystyrol Röhrchen bei 1.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und zweimal mit PBS unter Zusatz von 1% BSA und 0,1% Natriumazid (Facs-Lösung) gewaschen. Als erstes wurde 10 μ l des

spezifischen Antikörpers für einen der vier Trail-Rezeptoren (anti-TRAIL-R1, anti-TRAIL-R2, anti-TRAIL-R3, anti-TRAIL-R4) oder der zwei Isotypkontrollen (anti-IgG2a, anti-IgG1) (jeweilige Konzentration: 100 µg/ml) zugegeben, vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschvorgängen bei 1.000 x g für 5 Minuten mit Facs-Lösung, wie zuvor beschrieben, wurde ein FITC-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (4 µl/Probe) zugegeben. Es folgte eine erneute 30-minütige Inkubation bei 4 °C, die aufgrund der zugegebenen Fluoreszenz im Dunkeln stattfand. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit der Facs-Lösung gewaschen und in 500 µl von dieser zur Analyse im FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson) resuspendiert.

Ein Vorhandensein des untersuchten Oberflächenrezeptors wurde als Fluoreszenzzunahme im Vergleich zum Isotyp nachgewiesen und stellte sich nach Analyse im CellQuest Auswertungsprogramm als Verlagerung des Peaks nach rechts dar.

2.2.3 Gewinnung von RNA und Proteinen

Die Gewinnung von RNA und Proteinen erfolgte aus Ewing-Sarkom Zelllinien, die entweder für 24, 48 oder 72 Stunden mit IFN-γ (Endkonzentration: 2.000 IU/ml) behandelt oder solchen, die jeweils parallel dazu als Nativkontrollen keiner Behandlung unterzogen worden waren. Die Zellen wurden für diesen Versuch in pro Ansatz drei 100 mm Ø Zellkulturplatten in jeweils 10 ml Kulturmedium kultiviert.

Die Isolation von RNA und Proteinen aus diesen Zellen erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen Kits: PeqGOLD TriFast, das auf einer Einschritt-Flüssigkeitsphasen-Separation beruht. PeqGOLD TriFast enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in 3 Phasen auf: RNA in wässriger Phase, DNA in organischer und Interphase und Proteine in der organischen Phase.

Die Präzipitation der RNA erfolgte aus der wässrigen Phase mittels Isopropanol in einer 10minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C. Anschließend wurde sie zweimal mit 75%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die so gewonnene RNA wurde in DEPC-Wasser resuspendiert und bei -70 °C zur Weiterverarbeitung konserviert.

Nach Ausfällen der DNA aus der übriggebliebenen organischen und Interphase durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 2.000 x g und 4 °C mit 100%-igem Ethanol, wurden aus dem neu gewonnenen Überstand Proteine aufgereinigt. Dies erfolgte mit Hilfe einer Isopropanol Präzipitation für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C. Anschließend wurde das entstandene Proteinpellet zunächst mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95%-igem Ethanol und danach mit 100%-igem Ethanol gereinigt und getrocknet. Zur Konservierung wurden die Proteine in einer 10%-igen SDS-Lösung aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Die Durchführung der Methode erfolgte nach dem mitgelieferten Herstellerprotokoll.

2.2.4 RT-PCR

Ein Teil der mit Hilfe der in 2.2.3 erläuterten Methode gewonnenen RNA wurde nach Aufnahme in DEPC-Wasser und spektrometrischer Quantifizierung für eine RT-PCR verwendet.

Es wurde in einem ersten Schritt aus 3 µg der zu untersuchenden mRNA mit Hilfe von Random-Primern und Reverse Transkriptase in einem Reaktionsgemisch (dNTP, DTT, 5X First strand buffer, DEPC-Wasser) von insgesamt 12 µl cDNA synthetisiert. Als Positivkontrolle diente mRNA der Zelllinie K562. Die Reaktionsbedingungen waren: 2 min bei 42°C Annealing der Primer, 60 min bei 42°C, 15 min bei 70°C und 20 min bei 37°C.

Im zweiten Schritt wurde jeweils 1 µl der gewonnenen cDNA eingesetzt um mit den spezifischen Primern (s. Tabelle 2.1) die Expression von mRNA des betreffenden Gens nachzuweisen. Dazu wurden dem Reaktionsgemisch (MgCl₂, 10X PCR-Buffer, dNTP, DEPC-Wasser) von insgesamt 100 µl jeweils 2µl des sense-, 2µl des anti-sense Primers (200 µM) und 0,5 µl Taq-Polymerase zugegeben. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden einer Veröffentlichung von Ribeiro et al. entnommen (Ribeiro et al. 1998) und sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Als Kontrolle wurden einem Reaktionsgefäß keine Primer zugesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren: initiale Denaturierung in einem Zyklus für 2 min bei 94°C und für 1 min bei 95°C, 35 Zyklen mit 45 Sekunden Denaturierungszeit bei 95°C, 45 Sekunden Annealing bei 54°C und Extension von 70 Sekunden bei 72°C und einem abschließenden Extensionsschritt mit 1 Zyklus für 10 min bei 72°C.

Nach Beendigung der PCR wurden je 10µl der Proben mit Zusatz von Ladepuffer auf ein selbst hergestelltes 1,75 %iges Agarosegel aufgetragen und darin bei 110 V für ungefähr 50 min elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente eine DNA-Leiter. Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels in Ethidiumbromid und die Darstellung der Banden mit Hilfe einer UV-Videodokumentation.

TRAIL	
Sense:	5'-CTG CGT GCT GAT CGT GAT C-3'
anti-Sense:	5'-GCC AAC TAA AAA GGC CCC G-3'
β-Aktin	
Sense:	5'-AAG AGA TGG CCA CGG CTG CT-3'
anti-Sense:	5'-TCG CTC CAA CCG ACT GCT GT-3'

Tabelle 2.1: Sequenzen der verwendeten Primer

2.2.5 Western Blot

Die mittels der in 2.2.3 beschriebenen Methode isolierten Proteine in 10%-iger SDS-Lösung wurden bezüglich der gewonnenen Proteinmenge mit Hilfe des DC Protein Assays (BioRad) dem Herstellerprotokoll folgend quantifiziert. Bei diesem Verfahren kommt es zum einen durch die Reaktion des vorhandenen Proteins mit Kupfer in einer alkalischen Lösung, und zum anderen durch eine Reduktion von Folin durch das kupferbehandelte Protein zu einer charakteristischen blauen Farbentwicklung, die ihre maximale Absorption bei 750 nm hat. Die Intensität der Farbentwicklung steht in direkter Relation zu der Menge des vorhandenen Proteins, die sich so mit Hilfe eines Standards mit definierter Proteinkonzentration photometrisch quantifizieren lässt.

Jeweils 50 µg lysiertes Protein wurde für 10 Minuten durch Aufkochen denaturiert und dann auf ein Gradienten SDS-Polyacrylamidgel (4-20%) aufgetragen. Nach Separation der Proteine mittels Elektrophorese erfolgte ein Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe einer Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell.

Nach Blocken der unspezifischen Proteinbindungen durch ein 30-minütiges Bad in PBS / 5% fettarme Trockenmilch / 0,01% Tween wurden die Membranen zunächst in blockendem Puffer mit Zusatz des primären Antikörpers (anti-human cFlip 1:500 für 4 Stunden, anti Caspase-8 1:1.000 für 8 Stunden, anti-β-Aktin 1:2.000 für 1 Stunde) inkubiert. Dann folgten ein Waschschrift, in dem sie dreimal für 5 Minuten in PBS / 0,01% Tween geschwenkt wurden und die 30-minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper.

Nach einem erneuten Waschschrift wurden dann die Proteine mittels einer Horseradish-Peroxidase Reaktion mit dem gebundenen Zweitantikörper in einem nicht radioaktiven, auf Chemolumineszenz beruhenden Verfahren (ECL-Reagenz) auf Röntgenfilm sichtbar gemacht (s. Abbildung).

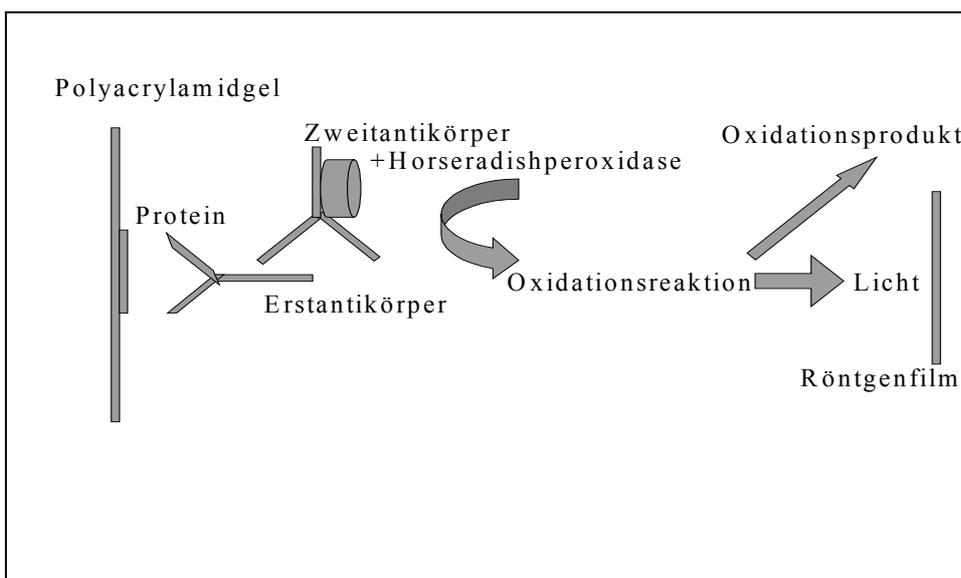


Abb.2.1: Quelle: "ECL Western blotting detection reagents", Seite 7, Amersham Pharmacia

2.2.6 RNase Protektionsversuch

Die in 2.2.3 gewonnene RNA wurde spektrometrisch quantifiziert und in DEPC Wasser bei -70°C konserviert.

Bei dem RNase Protektionsversuch handelt es sich um ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von mRNA. Sie basiert auf der Entdeckung einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase in den Bakteriophagen SP6, T7 und T3. Mit Hilfe dieser RNA-Polymerase werden aus DNA-Vorlagen durch Zusatz von α - ^{32}P -markiertem UTP radioaktiv markierte anti-sense RNA-Einzelstränge synthetisiert. Diese werden im folgenden Schritt mit $3\ \mu\text{g}$ der zu untersuchenden RNA über Nacht hybridisiert. Nach Zugabe von RNase zur Verdauung von Einzelsträngen und nicht hybridisierter RNA werden die sogenannten protected probes auf einem 5%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels der eingebauten Radioaktivität auf Röntgenfilm sichtbar gemacht (Abb. 2.2).

Bei der Durchführung dieser Methode wurde streng dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die in 2.2.3 gewonnene RNA wurde mit Hilfe von 4 verschiedenen kommerziell-erhältlichen apoptoserelevanten DNA-Vorlagen dieses RNase Protektionsversuch Systems, nämlich hAPO 1c (Caspasen), hAPO 2c (Bcl-2 Familie), hAPO 3c (Todesrezeptoren) und hAPO 5c (IAP-Familie) untersucht. Jede Vorlage enthält zusätzlich L32 und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als House keeping Gene.

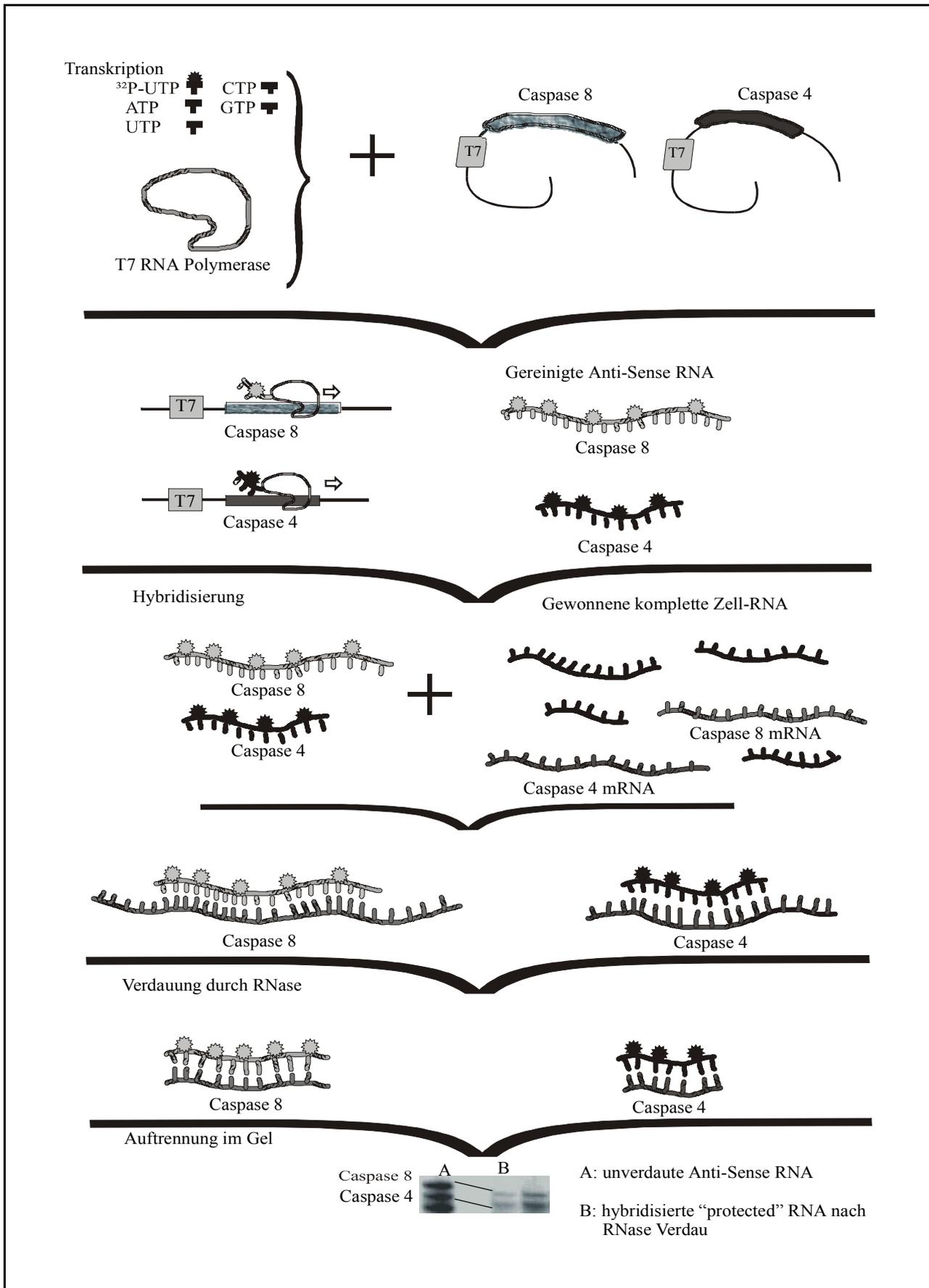


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der RNase Protektionsversuch Methode, das Sternchen steht jeweils für die Markierung durch Radioaktivität, Quelle: „RiboQuant – Multi-Probe RNase Protection Assay Systems“, Seite 4, Pharmingen

3 Ergebnisse

3.1 Sensitivität von ES Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose

Die neun zur Verfügung stehenden Ewing-Sarkom Zelllinien werden zunächst auf ihr Ansprechen auf die apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL hin untersucht.

Dazu werden sie für 24 Stunden mit rhTRAIL (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert und anschließend der Prozentsatz von apoptotischen Kernen im Durchflusszytometer nach der Methode von Nicoletti et al. quantifiziert.

Dabei zeigt sich bei sieben der neun Zelllinien ein deutliches Ansprechen auf TRAIL; die beiden Zelllinien A4573 und JR dagegen erweisen sich als resistent (Abb. 3.1).

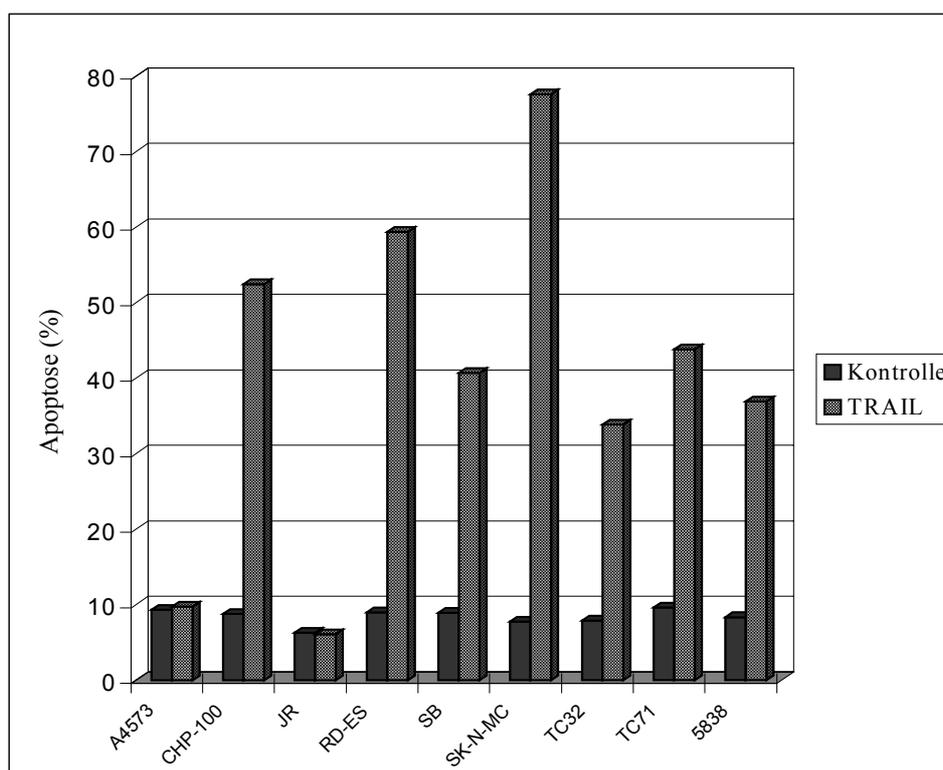


Abb. 3.1: Wirkung von TRAIL auf die 9 ES Zelllinien. Die schwarzen Säulen zeigen jeweils die unbehandelten Zellen als Kontrolle und die karierten Säulen die Zellen, die einer 24stündigen TRAIL Behandlung (200 ng/ml) unterzogen worden sind. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde durchflusszytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. bestimmt.

3.2 Untersuchung der Resistenzursache bei den ES-Zelllinien A4573 und JR

3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der zelloberflächengebundenen Rezeptoren für TRAIL

Auf der Suche nach Gründen für die TRAIL-Resistenz von A4573 und JR wird zunächst die Expression der TRAIL-Rezeptoren auf den neun Ewing-Sarkom Zelllinien im Durchflusszytometer untersucht.

Für TRAIL gibt es vier oberflächengebundene Rezeptoren TRAIL-R1-R4. Allerdings kann nur über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Apoptose ausgelöst werden. Für die Apoptoseinduktion genügt das Vorhandensein eines dieser beiden Rezeptoren. TRAIL-R3 und TRAIL-R4 besitzen keine Todesdomäne und sind somit nicht in der Lage, ein Apoptosesignal nach intrazellulär zu übermitteln. Von einigen Arbeitsgruppen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TRAIL-R3 und –R4 mit den beiden apoptosevermittelnden Rezeptoren TRAIL-R1 und –R2 um die Bindung von TRAIL konkurrieren und so im Sinne einer kompetitiven Hemmung die Überexpression von TRAIL-R3 und –R4 für die Resistenz der Zelllinien gegenüber TRAIL verantwortlich gemacht werden kann.

Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigt (Abb. 3.2), dass A4573 und JR sowohl TRAIL-R1, als auch TRAIL-R2 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Damit unterscheiden sie sich nicht von den sieben sensiblen Ewing-Sarkom Zelllinien, die bis auf CHP und SK-N-MC, ebenfalls über beide Rezeptoren auf ihrer Oberfläche verfügen. Die zwei sensiblen Zelllinien CHP und SK-N-MC besitzen lediglich TRAIL-R2.

TRAIL-R3 und TRAIL-R4 sind bei A4573 und JR, und ebenso bei den übrigen sieben TRAIL-sensiblen Zelllinien, wenn überhaupt, nur in minimalem Ausmaß auf der Zelloberfläche vorhanden. Die Resistenzursache scheint somit nicht in einer unterschiedlichen Expression von TRAIL-Rezeptoren auf den Zelloberflächen zu bestehen.

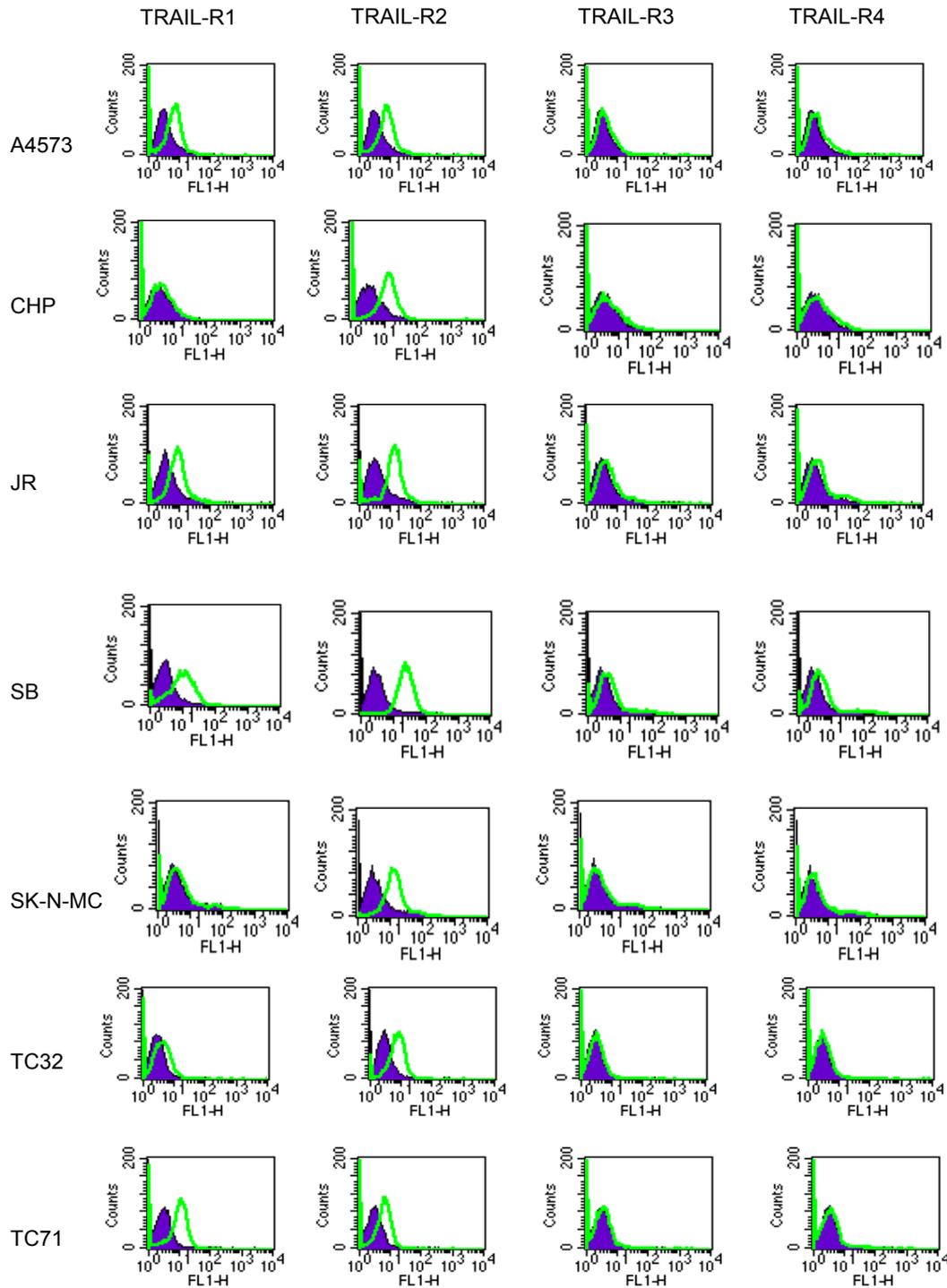


Abb. 3.2: Expression der Zelloberflächenrezeptoren für TRAIL. Die geschlossenen Kurven zeigen die jeweiligen Isotyp Kontrollen, die mit Hilfe eines unspezifischen Maus IgG-Antikörpers erstellt wurden und die offenen Kurven zeigen die mit den spezifischen TRAIL-Rezeptor Antikörpern (TRAIL-R1-R4) inkubierten Zellen. Ein Abweichen der offenen von der geschlossenen Kurve nach rechts zeigt das Vorhandensein des jeweiligen Rezeptors auf der Zelloberfläche. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie durch FITC-Markierung des Zweitantikörpers (Anti-Maus-FITC) erhoben.

3.2.2 Expression von cFLIP bei den 9 ES Zelllinien im Western Blot

Als weitere mögliche Resistenzursache kommt die Expression des intrazellulären Inhibitors cFLIP (cellular FLICE inhibitory protein) in Frage. Diese wurde zuvor in verschiedenen Zellsystemen als Grund von Resistenz gegenüber Fas Ligand und TRAIL beschrieben.

Bei cFLIP handelt es sich um ein Protein, das in seiner Sequenz der ProCaspase-8 ähnelt. Aufgrund dieser Tatsache ist es in der Lage, mit der ProCaspase-8 um die Bindung ihres Kofaktors FADD zu konkurrieren und so über eine kompetitive Hemmung die Aktivierung der apoptosevermittelnden Caspasen-Kaskade zu verhindern.

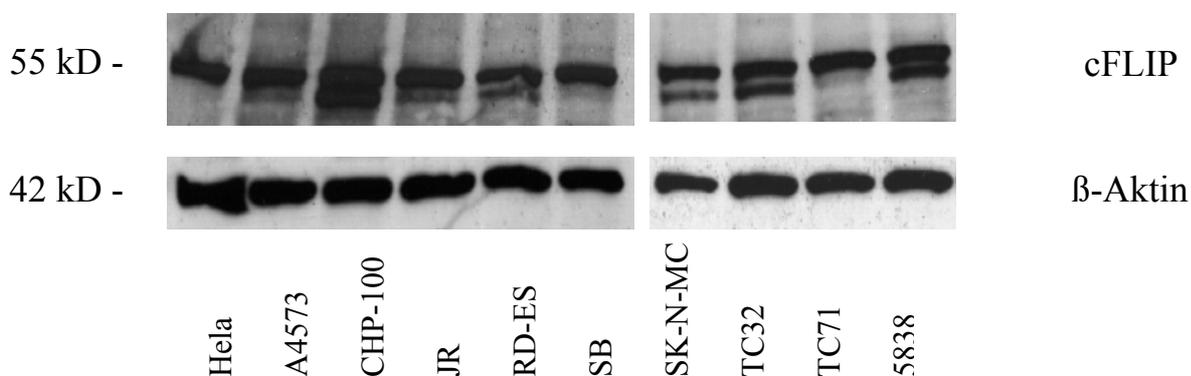


Abb. 3.3: Expression von cFLIP bei den 9 ES Zelllinien. Die Abbildung zeigt die Expression des Proteins cFLIP im Western Blot. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

Die Untersuchung der neun Ewing-Sarkom Zelllinien auf das Expressionsmuster dieses Proteins im Western Blot (Abb. 3.3) zeigt ein homogenes Vorhandensein von cFLIP. Da sich in TRAIL sensitiven und resistenten Zellen kein Unterschied in der cFLIP-Expression nachweisen läßt, ist somit auch eine Überexpression von cFLIP als mögliche Resistenzursache auszuschließen.

3.2.3 Expression der mRNA verschiedener apoptoseassoziierter Proteine im RNase Protektionsversuch

Um ein Bild davon zu bekommen, ob und auf welche Weise sich die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR von den gegenüber TRAIL sensiblen Ewing-Sarkom Zelllinien unterscheiden, wird bei allen neun Zelllinien das Expressionsmuster verschiedener Gruppen apoptoseassoziierter Proteine auf mRNA Ebene im RNase Protektionsversuch untersucht.

3.2.3.1 Die Gruppe der Caspasen

Bei den Caspasen handelt es sich um eine Familie von Cystein-Proteasen, die, getriggert durch proapoptotische Signale, eine intrazelluläre Kaskade vermitteln, die über die Spaltung einer Reihe von essentiellen Proteinen letztlich zum Zerfall der Zelle führt. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt, zum einen die Initiator Caspasen, von denen Caspase-8, -9 und -10 die wichtigsten Vertreter darstellen und zum anderen die Effektor Caspasen, zu denen Caspase-3, -7 und -6 gehören (Abb. 3.4).

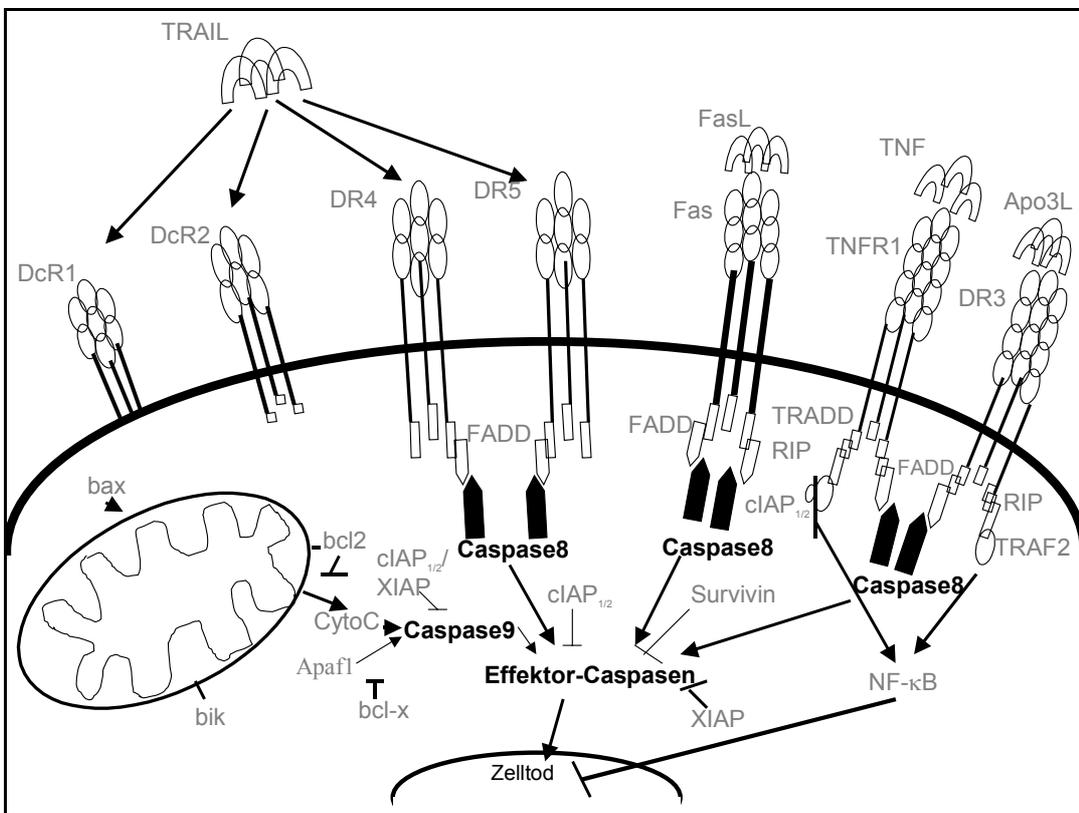


Abb.3.4: Rolle der Caspasen (die hier untersuchten sind schwarz hervorgehoben) innerhalb der Apoptosekaskade

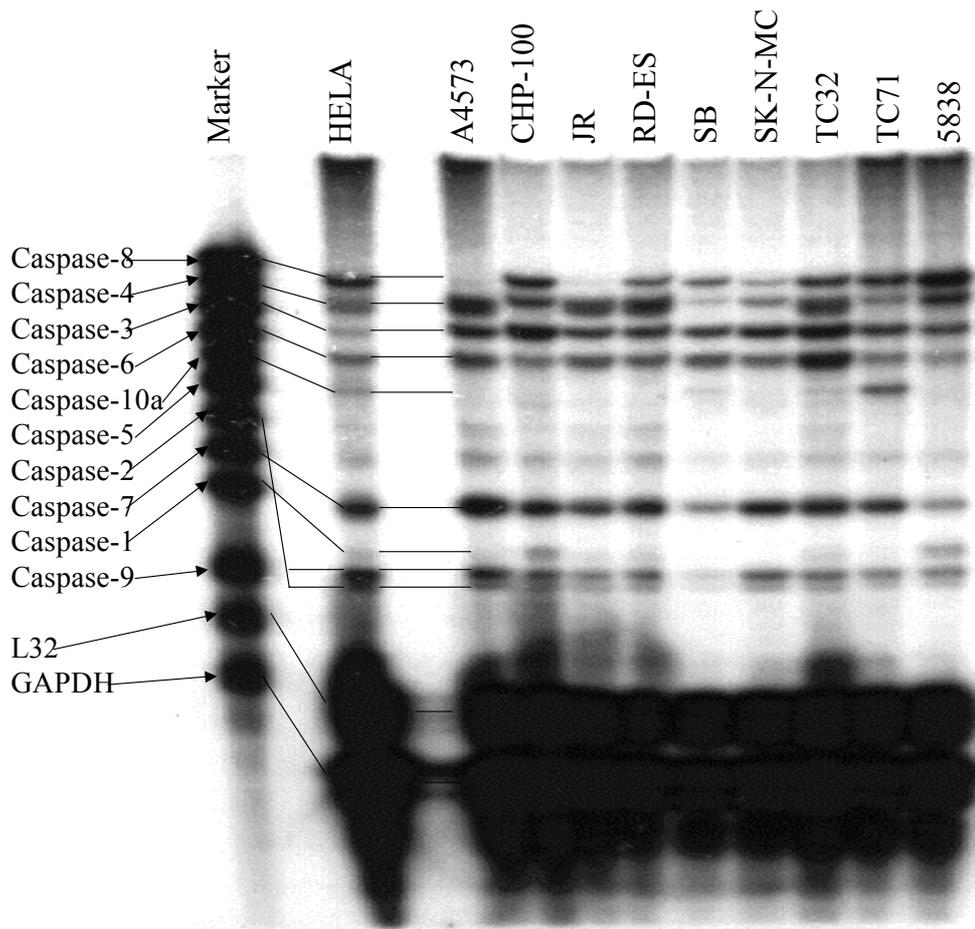


Abb. 3.5: Expression der Caspasen-1-10 bei den 9 ES Zelllinien. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela-RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle.

Der RNase Protektionsversuch (Abb. 3.5) zeigt, dass sich die einzelnen Zelllinien in ihrem mRNA-Muster, bezogen auf die Caspasen-1-10, unterscheiden. Auffallend ist in Bezug auf die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR, dass sie sich von den restlichen Ewing-Sarkom Zelllinien durch eine ausgesprochen schwache Caspase-8 Expression unterscheiden. Hinsichtlich der Expression der übrigen Caspasen zeigen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen resistenten und sensiblen Zelllinien.

Innerhalb der sensiblen Zelllinien zeigt sich ein heterogenes Expressionsmuster der Caspasen. So ist Caspase-4 mRNA bei SB deutlich schwächer exprimiert als bei allen anderen Zelllinien; Caspase 10a ist nur bei TC71 und Caspase-1 lediglich bei CHP und 5838 deutlich nachweisbar.

Da die Caspase-8 eine zentrale Rolle im TRAIL-Signalweg spielt, könnte eine zu geringe Expression dieser Caspase in den Zelllinien A4573 und JR für die Resistenz gegenüber TRAIL verantwortlich sein.

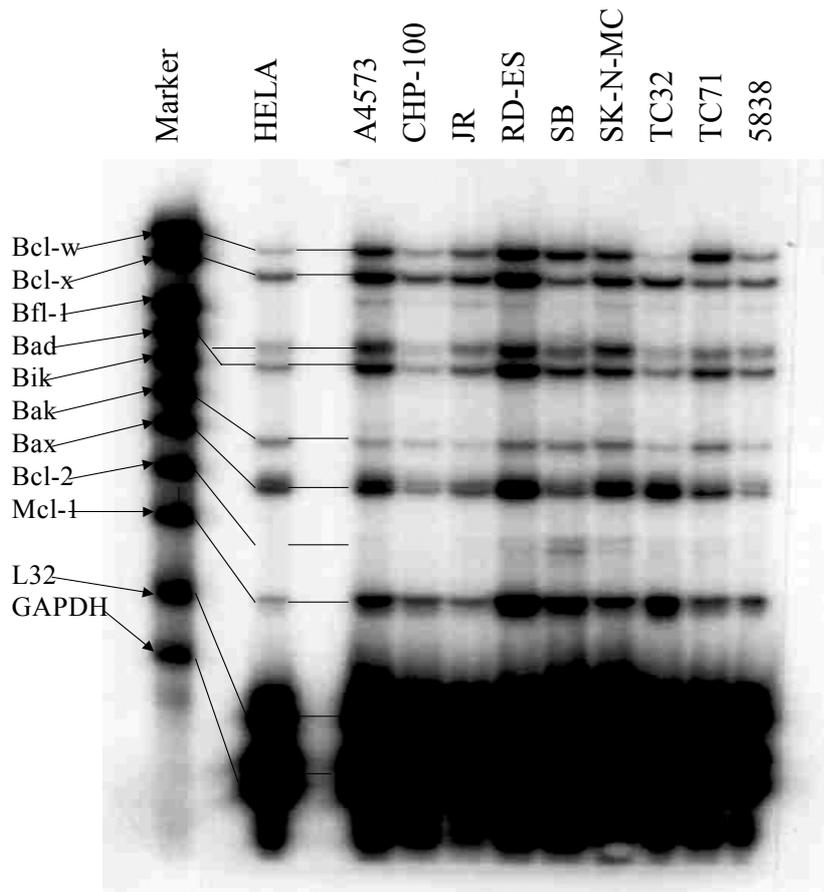


Abb. 3.7: Expression der Mitglieder der Bcl-2 Familie in den 9 Ewing-Sarkom Zelllinien. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela-RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle.

Auf mRNA-Ebene (Abb. 3.7) zeigen sich nur geringe Unterschiede in der Ausprägung zur Bcl-2 Familie gehörender Proteine zwischen den neun Ewing-Sarkom Zelllinien.

Was die zwei resistenten Zelllinien A4573 und JR betrifft, so unterscheidet sich ihr mRNA-Expressionsmuster bezogen auf diese Gruppe von apoptoseassoziierten Proteinen nicht von den anderen sieben sensiblen Ewing-Sarkom Zelllinien. Von den anti-apoptotischen Proteinen zeigt sich bei Bcl-x und Mcl-1 kein Unterschied in der mRNA Expression, lediglich Bcl-2 ist nur bei SB deutlich und Bcl-w im Vergleich schwächer bei CHP und TC32 exprimiert.

Die m-RNA Expression der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie zeigt hinsichtlich Bak und Bax keine Unterschiede, nur bad ist bei CHP und TC32 etwas schwächer ausgeprägt.

3.2.3.3 Die Todesrezeptoren

Bei den Todesrezeptoren handelt es sich um eine Gruppe von Oberflächenrezeptoren, die zur TNF (Tumor Necrosis Factor) Rezeptor Gen Superfamilie gehören.

Über diese Rezeptoren, zu denen neben Fas, TNFR und DR3 (Death Receptor) auch zwei der vier TRAIL-Rezeptoren gehören, wird, wenn sie ihre spezifischen Liganden, zum Beispiel TNF, Apo3L, FasL oder TRAIL binden, intrazellulär meist über FADD und Caspase-8 das Apoptosesignal weitervermittelt.

Bei TRADD (TNF-R associated death domain) und RIP (receptor interacting protein), die gemeinsam mit den Todesrezeptoren hier auf ihre mRNA Expression hin untersucht wurden, handelt es sich um Proteine, die mit den intrazellulären Domänen der Todesrezeptoren interagieren. TRADD ist bei TNFR und DR3 zwischen die intrazytoplasmatische Rezeptordomäne und ein weiteres vermittelndes Protein geschaltet. RIP ist ein solches weiterführendes Protein, das über TRAF2 bei DR3 und TNFR die zwei anti-apoptotischen intrazellulären Signalwege NF- κ B oder JNK/AP1 aktiviert (Abb. 3.8).

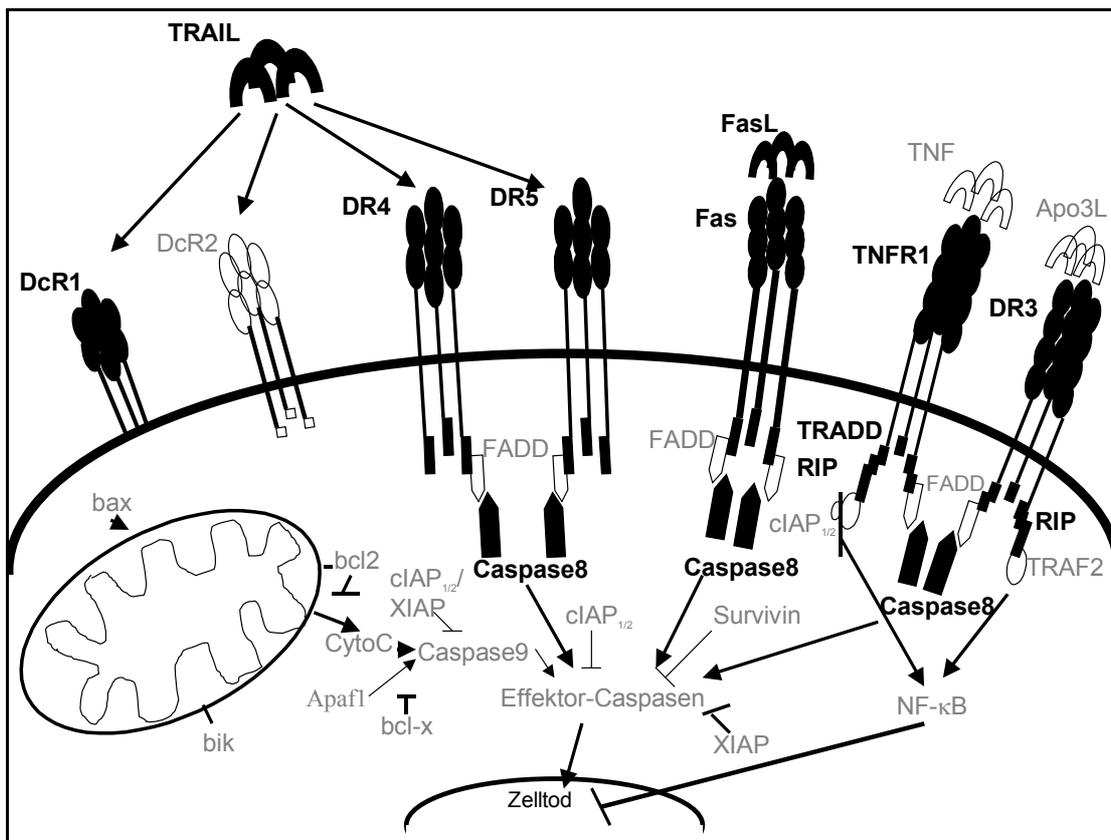


Abb. 3.8: Die Rolle der Todesrezeptoren und Adapterproteine (die untersuchten sind hier schwarz hervorgehoben) innerhalb der Apoptosekaskade

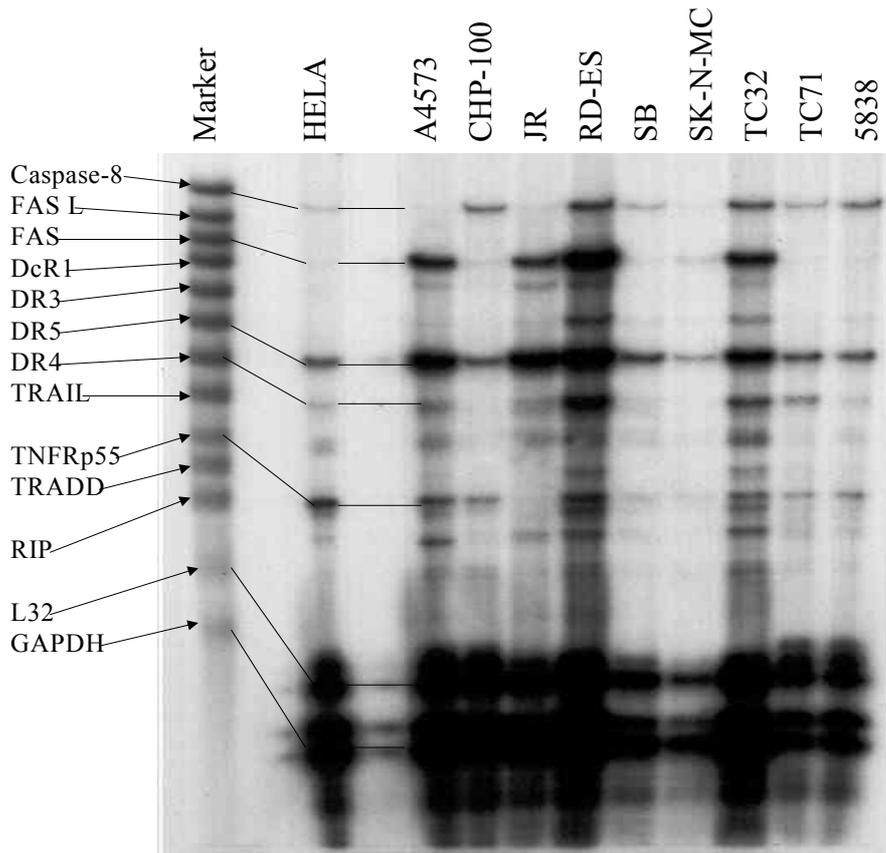


Abb. 3.9: Expression der Gruppe der Todesrezeptoren bei den 9 ES Zelllinien. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela-RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle. Aufgrund von technischen Schwierigkeiten sind die Banden bei SB und SK-N-MC insgesamt etwas schwächer exprimiert.

In Bezug auf diese Gruppe apoptoseassoziiierter Proteine zeigen sich eine Reihe von Unterschieden zwischen den einzelnen Ewing-Sarkom Zelllinien im RNase Protektionsversuch (Abb. 3.9).

Bei diesem insgesamt sehr heterogenen Expressionsmuster ist wieder die kaum wahrnehmbare Expression von Caspase-8 mRNA bei den beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR hervorzuheben, die bereits in 3.3.3.1 beschrieben wurde. Sonst ergeben sich keine neuen Unterschiede zwischen TRAIL-resistenten und –sensiblen Zelllinien.

Ganz allgemein erlaubt die aufgrund von Beladungsunterschieden schlechte Qualität dieses RNase Protektionsversuchs nur eine eingeschränkte Aussage über die genauen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien.

Deutlich wird lediglich eine nur schwach ausgeprägte Expression von DR 5 (TRAIL-R1) bei CHP und SK-N-MC, die mit den durchflusszytometrisch erhobenen Daten aus Abb. 3.2 korreliert, sowie die fehlende Expression von TNFR mRNA bei JR.

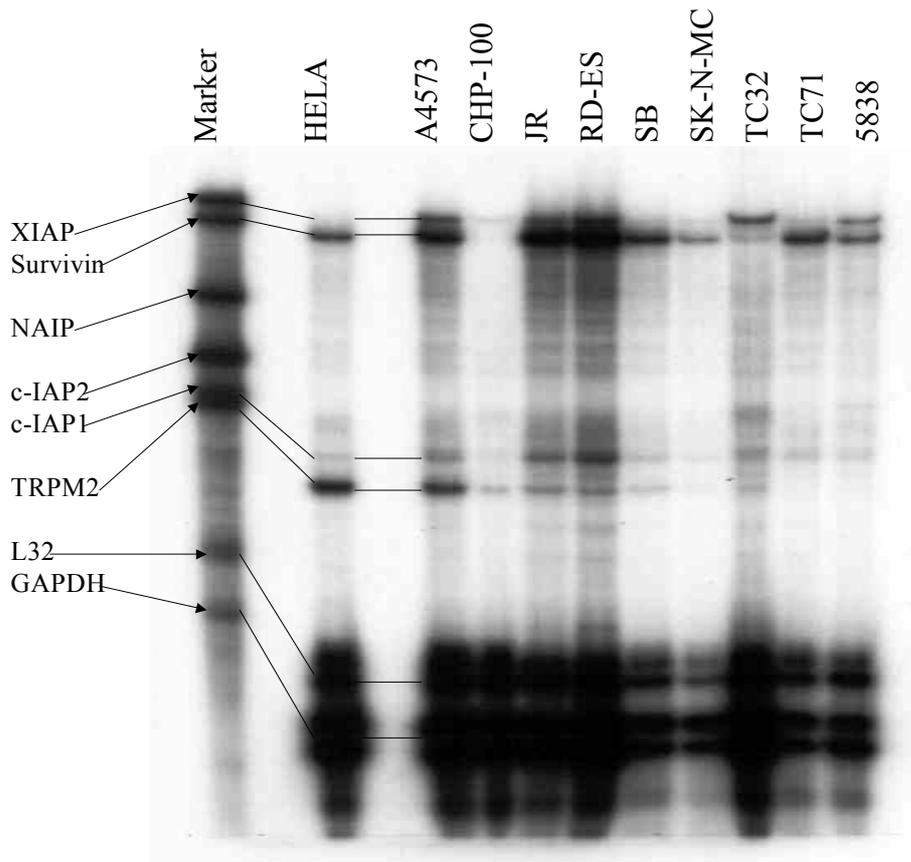


Abb. 3.11: Expression der Proteine der IAP Familie bei den 9 ES Zelllinien. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela-RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle.

Im RNase Protektionsversuch (Abb. 3.11) zeigt sich ein sehr heterogenes Expressionsmuster für die Mitglieder der IAP-Familie bei den neun Ewing-Sarkom Zelllinien.

Es wird kein Unterschied in der Expression der mRNA dieser Proteine zwischen TRAIL-resistenten und –sensiblen Zelllinien deutlich.

Hinzuweisen ist auf die heterogene Expression von Survivin bei den neun Zelllinien, die bei CHP und TC32 nur sehr schwach nachweisbar ist. Weiterhin fehlt NAIP bei allen neun Zelllinien und bei TC71, SK-N-MC und 5838 findet sich keine TRPM2 Expression.

3.2.3.5 Zusammenfassung der RNase Protektionsversuch-Ergebnisse für die 9 ES Zelllinien

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ein Zusammenhang zwischen dem Caspase-8 Mangel und der Resistenz der beiden Zelllinien A4573 und JR gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose bestehen könnte.

3.2.4 Expression von Caspase-8 im Western Blot

Um die Bedeutung des Caspase-8 mRNA Mangels, der in 3.2.3 nachgewiesen wurde, zu überprüfen, wird die Expression von Caspase-8 auf Proteinebene bei den neun Ewing-Sarkom Zelllinien im Western Blot untersucht (Abb. 3.12).

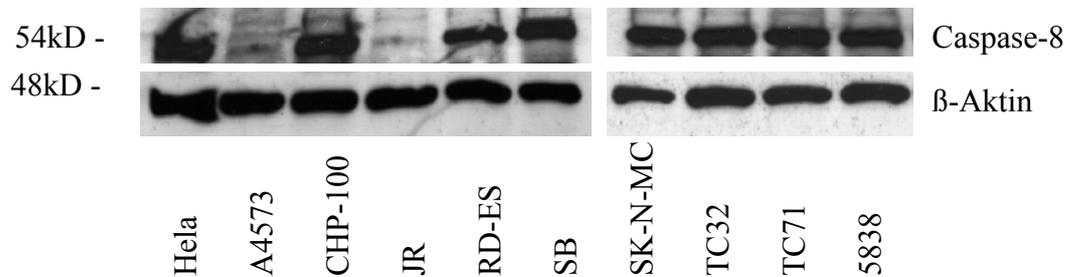


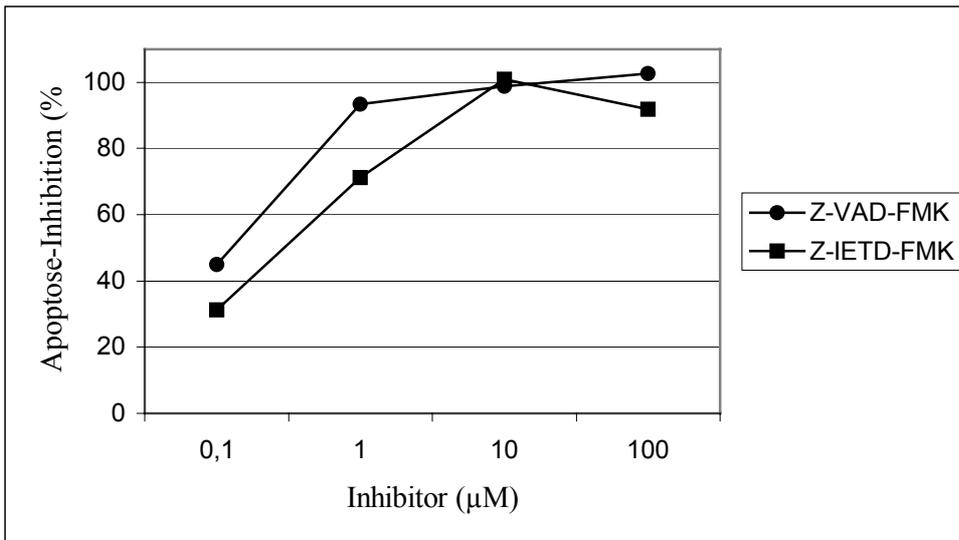
Abb. 3.12: Diese Abbildung zeigt die Expression des Proteins Caspase-8 im Western Blot. Als Ladekontrolle dient β -Aktin.

Hier zeigt sich auch im Western Blot ein deutlich abgeschwächtes Signal für Caspase-8 bei A4573 und JR im Vergleich zu den sieben sensiblen Ewing-Sarkom Zelllinien. Dies stützt die Hypothese aus 3.2.3.4, dass möglicherweise dieser Mangel an Caspase-8 für die Resistenz von A4573 und JR gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose verantwortlich ist.

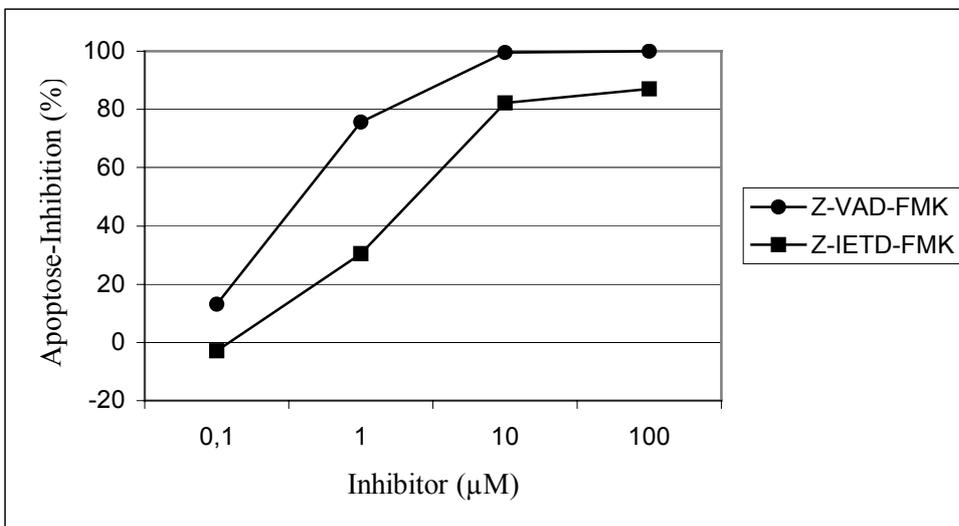
3.2.5 Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspase-8 Inhibitor

Um zu zeigen, dass TRAIL-vermittelte Apoptose über Caspase-8 vermittelt wird, und so der Mangel an Caspase-8 zumindest ein Grund für die Resistenz von A4573 und JR ist, wird bei sensiblen Zelllinien die Funktion von Caspase-8 gehemmt.

Dazu werden exemplarisch die beiden Zelllinien RD-ES und TC32 zunächst mit dem Caspase-8-Inhibitor (z-IETD-FMK) oder dem PanCaspasen-Inhibitor (z-VAD-FMK) für 30 Minuten vorinkubiert und dann für 24 Stunden mit TRAIL (Endkonzentration: 100 ng/ml) behandelt. Der Anteil apoptotischer Kerne wird durchflusszytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. bestimmt.



TC32



RD-ES

Abb. 3.13: Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspase-8-Inhibitor (z-IETD-FMK). Zusätzlich Kontrolle der möglichen Apoptoseinhibition mit PanCaspasen-Inhibitor (z-VAD-FMK). Der Anteil apoptotischer Kerne wurde durchflusszytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. bestimmt.

Es wird in Abbildung 3.13 deutlich, dass sich durch Inhibition der Caspase-8 die TRAIL-vermittelte Apoptose auch bei vorher überaus sensiblen Zelllinien fast vollständig hemmen lässt. Daher muss von einer essentiellen Rolle der Caspase-8 innerhalb der Apoptosevermittlung durch TRAIL ausgegangen werden.

3.3 Sensitivität von ES Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose nach IFN- γ Vorbehandlung

Aufgrund der Tatsache, dass IFN- γ in der Lage ist, die Sensibilität von Tumorzelllinien gegenüber TNF- α und Fas-vermittelter Apoptose zu erhöhen und in der antiviralen Therapie eine Regulierung der TRAIL-Wirkung durch IFN- γ beschrieben wurde, wird hier der Effekt von IFN- γ auf das Ansprechen der neun Ewing-Sarkom Zelllinien auf die apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL überprüft.

Die einzelnen Zelllinien werden für 60 Stunden mit IFN- γ (Endkonzentration 2000 IU/ml) vorinkubiert und dann für weitere 24 Stunden mit rhTRAIL (200 ng/ml) behandelt. Der Prozentsatz an apoptotischen Kernen (Abb. 3.14) wird durchflußzytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. ermittelt.

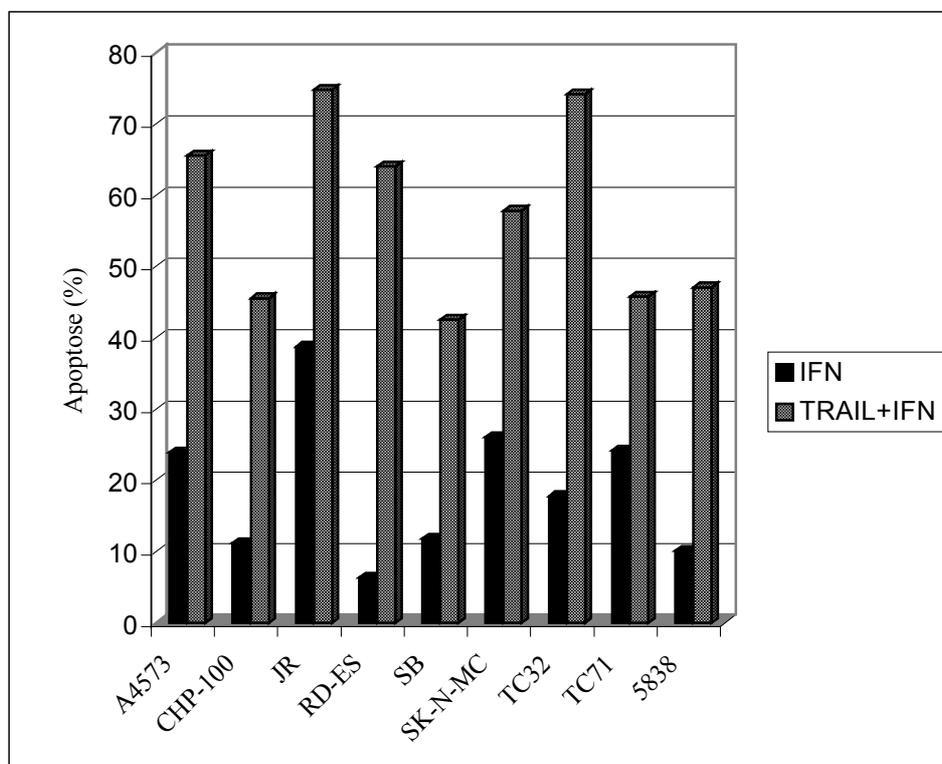


Abb.3.14: Wirkung von TRAIL nach IFN- γ Vorbehandlung auf die 9 ES Zelllinien. Die karierten Säulen zeigen die Zellen, die nach 60 Stunden IFN- γ -Behandlung für weitere 24 Stunden mit TRAIL behandelt wurden und die schwarzen Säulen stehen für die Kontrollzellen, die ebenfalls 60 Stunden mit IFN- γ behandelt wurden, aber dann ohne TRAIL weitere 24 Stunden kultiviert wurden. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durchflußzytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. bestimmt.

Die Abbildung 3.14 zeigt zum einen, dass IFN- γ -Behandlung alleine schon eine Steigerung der Apoptoserate bewirkt, und zum anderen, dass es die beiden zuvor resistenten Zelllinien A4573 und JR gegenüber der apoptoseinduzierenden Wirkung von TRAIL sensibilisiert (zum Vergleich Abb. 3.1).

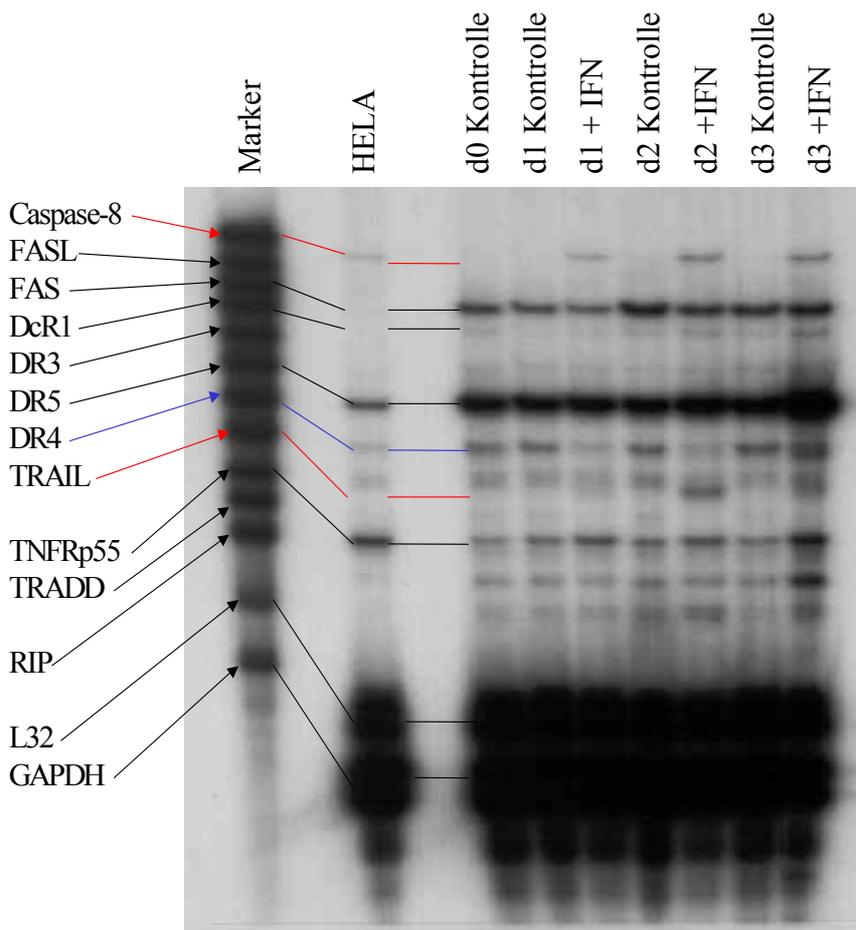
3.4 Untersuchung der Ursache für die Sensibilisierung der ES-Zelllinien A4573 und JR gegenüber TRAIL

3.4.1 Die Caspase-8 Expression nach IFN- γ Behandlung

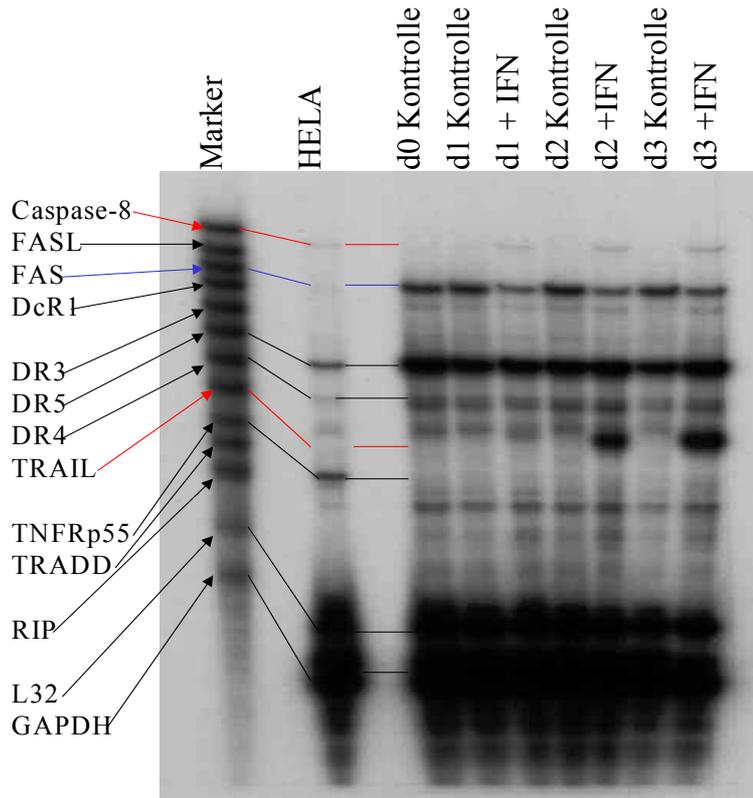
Um herauszufinden, welche Veränderungen in den durch IFN- γ behandelten Zellen, vor allem in den vorher resistenten, stattfinden und sie so gegenüber der apoptoseinduzierenden Wirkung von TRAIL sensibilisieren, werden die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR, und stellvertretend für die sensiblen Zelllinien, TC32 und TC71, einer IFN- γ Behandlung unterzogen.

Dazu werden jeweils eine Million Zellen in 10 ml Kulturmedium auf Zellkulturplatten (\varnothing 10cm) angesetzt und nach 24, 48 oder 72 Stunden IFN- γ Behandlung (2000 IU/ml) gemeinsam mit einer unbehandelten Kontrolle geerntet. Die aus den Zellen gewonnene mRNA wird zunächst mit Hilfe der RNase Protektionsversuch Vorlage hAPO 3c, welche die Gruppe der Todesrezeptoren untersucht, analysiert (Abb.3.15 A-D).

A

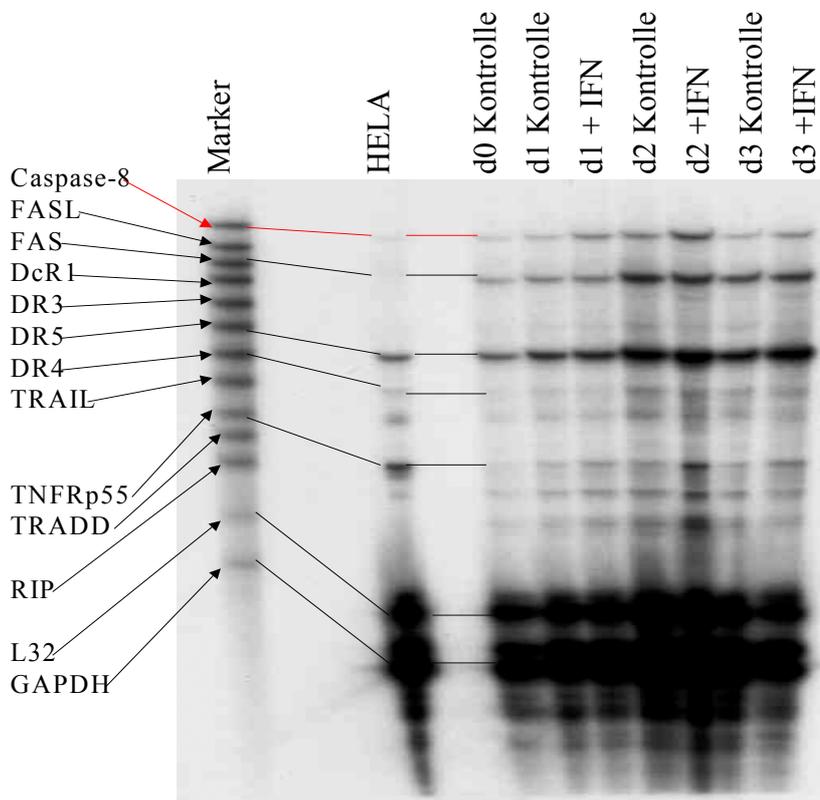


B



JR

C



TC32

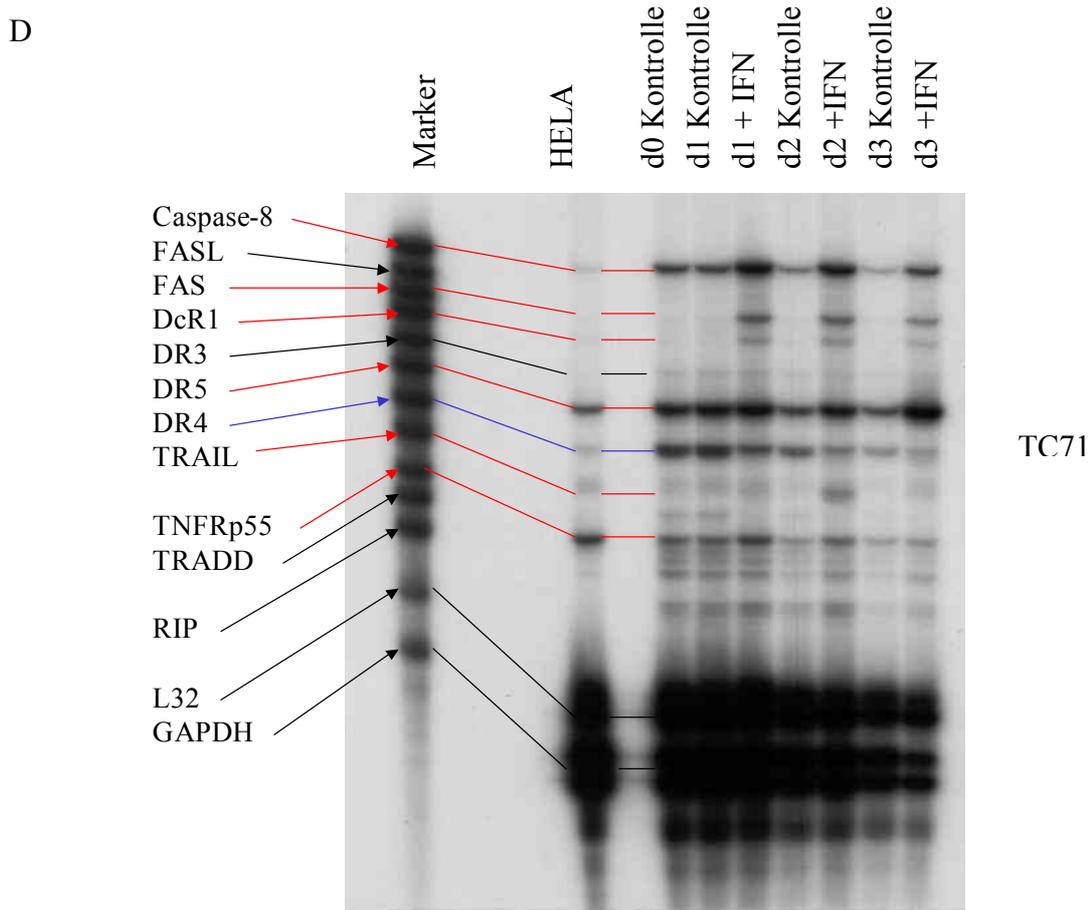


Abb. 3.15: Expression der Todesrezeptor-Gruppe bei den Zelllinien A4573 (A), JR (B), TC32 (C) und TC71 (D) jeweils nach 24, 48 oder 72 Stunden IFN- γ Behandlung mit Kontrollen. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle. Rote Pfeile bezeichnen die Banden für Proteine, die hochreguliert werden und blaue Pfeile die Banden für Proteine, die durch IFN- γ herunterreguliert werden.

Aus der vorangehenden Abbildung ist besonders hervorzuheben, dass es bei A4573 und JR zu einer deutlich vermehrten Caspase-8 Expression als Folge von IFN- γ Behandlung kommt. Dies ist besonders deshalb interessant, da Caspase-8 Mangel schon im Abschnitt 3.2 als Resistenzursache vermutet wurde und nun gezeigt werden konnte, dass eine Sensibilisierung gegenüber TRAIL (s. Abschnitt 3.3) mit einer Expressionszunahme von Caspase-8 einhergeht. Eine vermehrte Expression von Caspase-8 als Folge von IFN- γ Behandlung zeigt sich ebenfalls bei den Zelllinie TC71 und TC32.

In Bezug auf die anderen mit dieser RNase Protektionsversuch Vorlage untersuchten Proteine zeigt sich ein eher heterogenes Reaktionsmuster als Folge der IFN- γ Behandlung.

Bei JR kommt es zu einer verminderten Expression von FAS durch IFN- γ , die im Gegensatz dazu bei TC71 deutlich vermehrt ist. DcR1 (TRAIL-R3) wird bei TC71 leicht verstärkt exprimiert. Bei

TC71 kommt es darüber hinaus zu einer Hochregulation der DR5 (TRAIL-R2)- und einer leicht erhöhten TNF-R-Expression, sowie gemeinsam mit A4573 zu einer leicht verminderten DR4 (TRAIL-R1)-Expression. Erwähnenswert ist zudem die deutliche Hochregulation von TRAIL bei A4573, JR und TC71, welche exemplarisch für die Zelllinie JR in einer RT-PCR bestätigt wurde (Abb. 3.16).

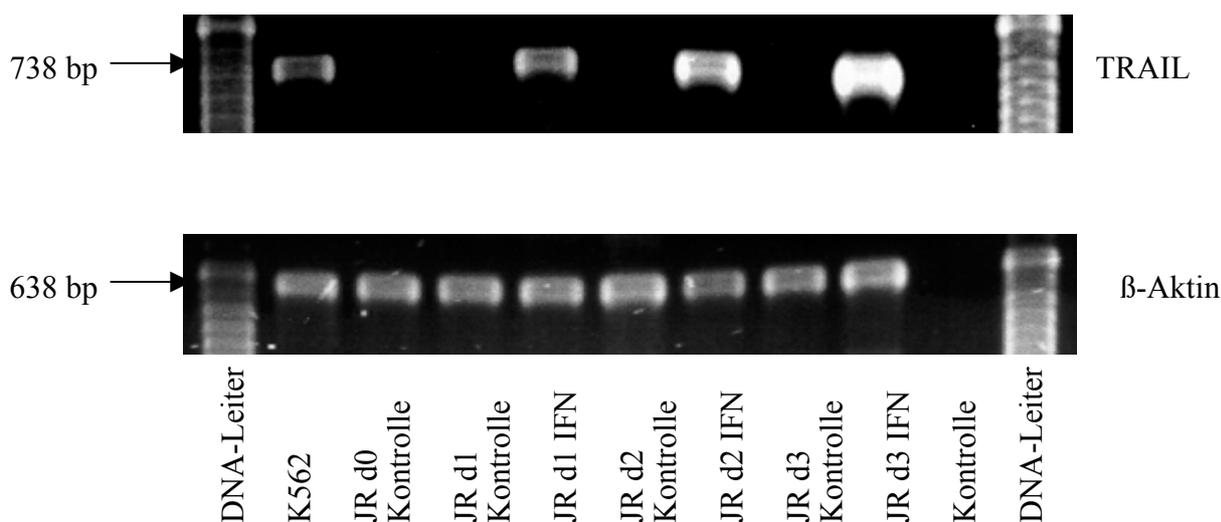


Abb. 3.16: RT-PCR für die Zelllinie JR nach IFN-Behandlung jeweils mit Kontrollen und β -Aktin als Ladekontrolle

Caspase-8 bleibt nach diesen Ausführungen bei A4573 und JR das einzige durch IFN- γ in gleichem Maße regulierte Element.

Aus den gleichen Zellen, die wie oben beschrieben, jeweils 24, 48 oder 72 Stunden mit IFN- γ behandelt wurden und den jeweiligen unbehandelten Kontrollen, wird neben der RNA auch Protein gewonnen.

Um zu überprüfen, ob die im RNase Protektionsversuch auf mRNA Ebene nachgewiesene Hochregulation der Caspase-8 Expression auch auf Proteinebene erfolgt, werden die Proteine im Western Blot aufgetrennt und mit einem anti-Caspase-8 Antikörper die Expression dieses Proteins bei A4573 und JR untersucht (Abb. 3.17).

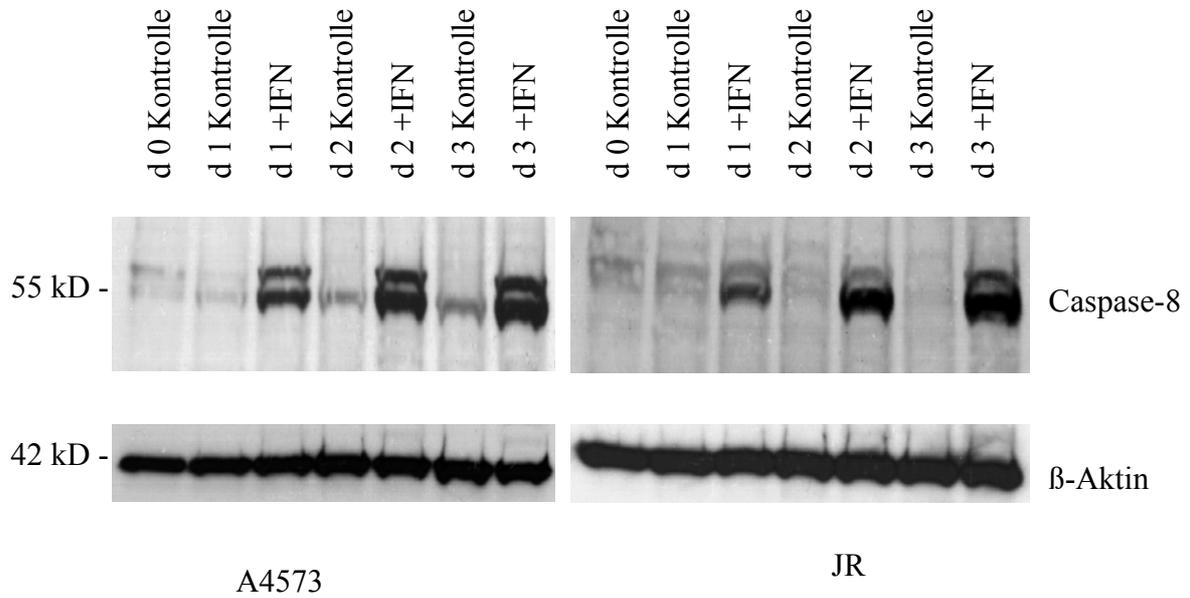


Abb. 3.17: Hochregulation der Caspase-8 Expression bei A4573 und JR im Western Blot jeweils nach 24, 48 oder 72 Stunden IFN- γ Behandlung mit Kontrollen. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

Auf Proteinebene zeigt sich ebenfalls deutlich die durch IFN- γ Behandlung induzierte Expression der Caspase-8 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

3.4.2 Veränderung anderer apoptoseassoziiierter Proteine durch IFN- γ im RNase Protektionsversuch

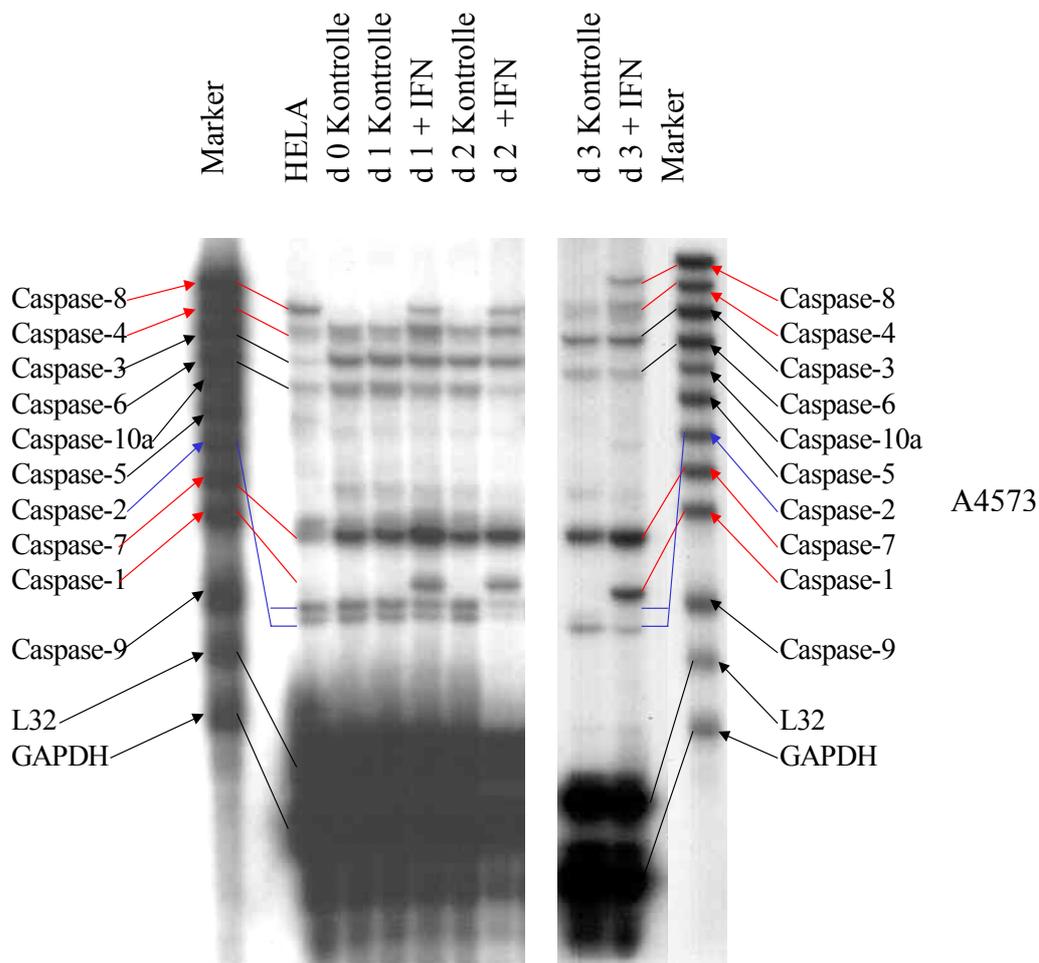
Um ein Bild von den Veränderungen zu bekommen, die IFN- γ induziert, werden auch verschiedene Gruppen weiterer apoptoseassoziiierter Proteine, die bereits aus dem vorangehenden Abschnitt 3.2 bekannt sind, auf Expressionsveränderungen untersucht.

Dies geschieht wieder für die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR sowie stellvertretend für die TRAIL-sensiblen Zelllinien, für TC32 und TC71.

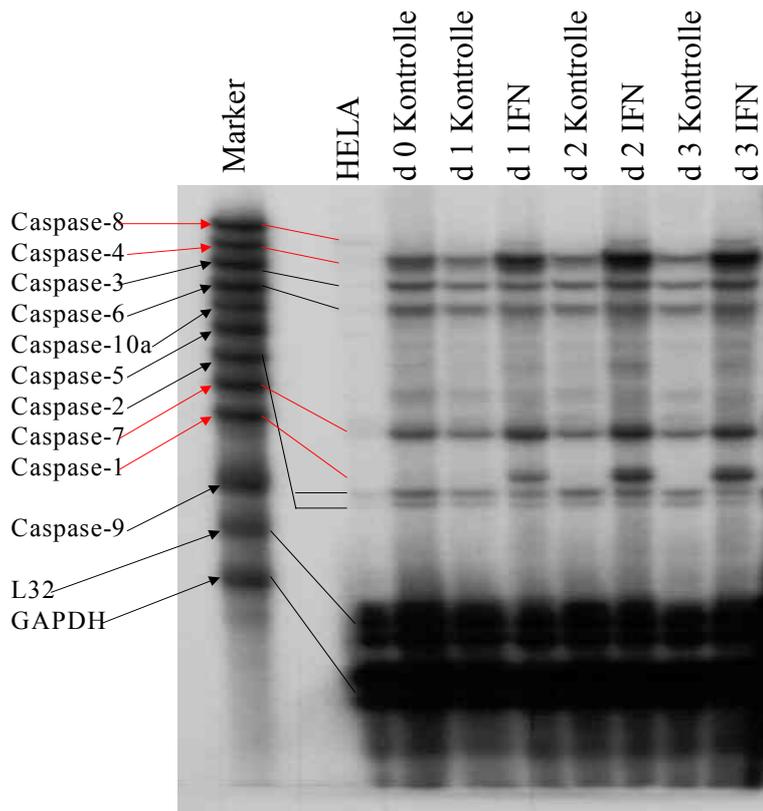
Es wird die gleiche mRNA verwendet wie für die RNase Protektionsversuche aus Abbildung 3.15. Dementsprechend handelt es sich um Zellen, die 24, 48 oder 72 Stunden mit IFN- γ behandelt wurden und dazugehörige unbehandelte Kontrollen.

3.4.2.1 Die Gruppe der Caspasen

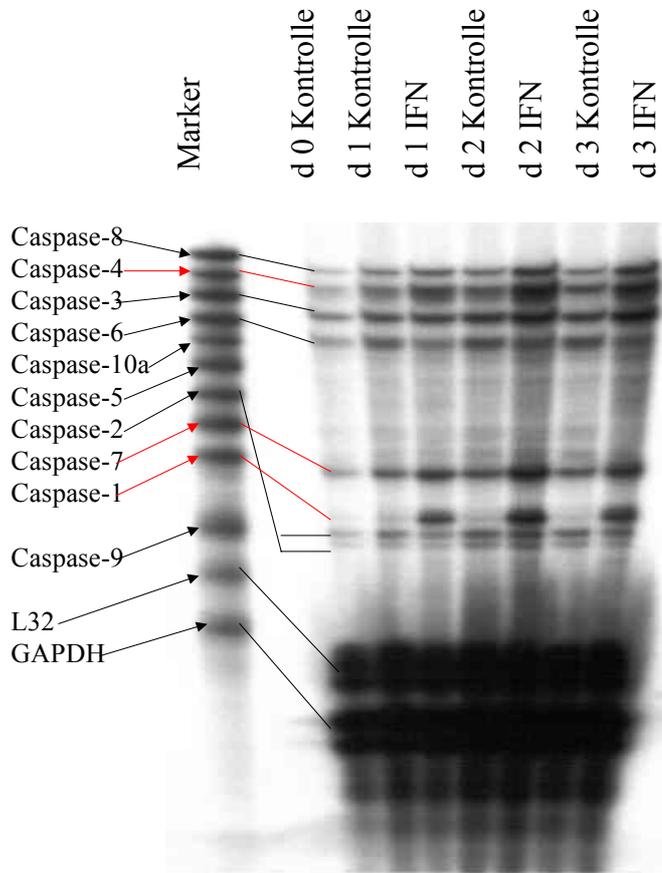
A



B



C



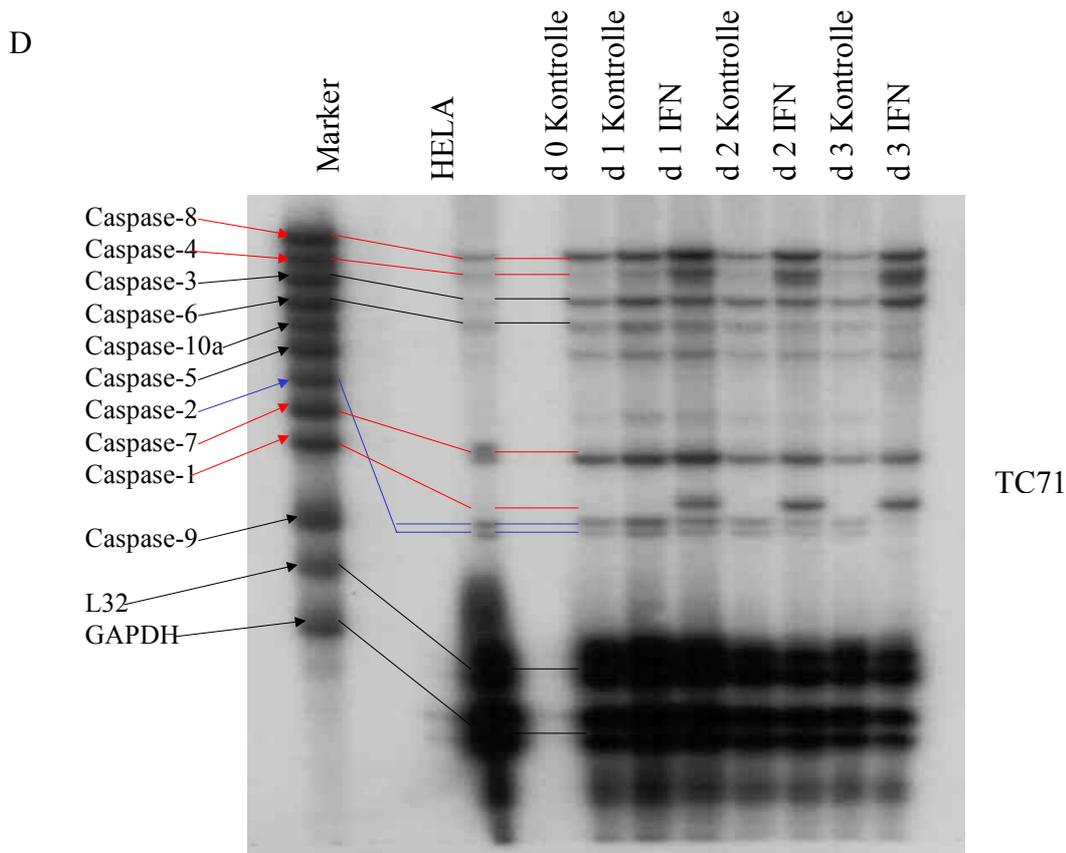
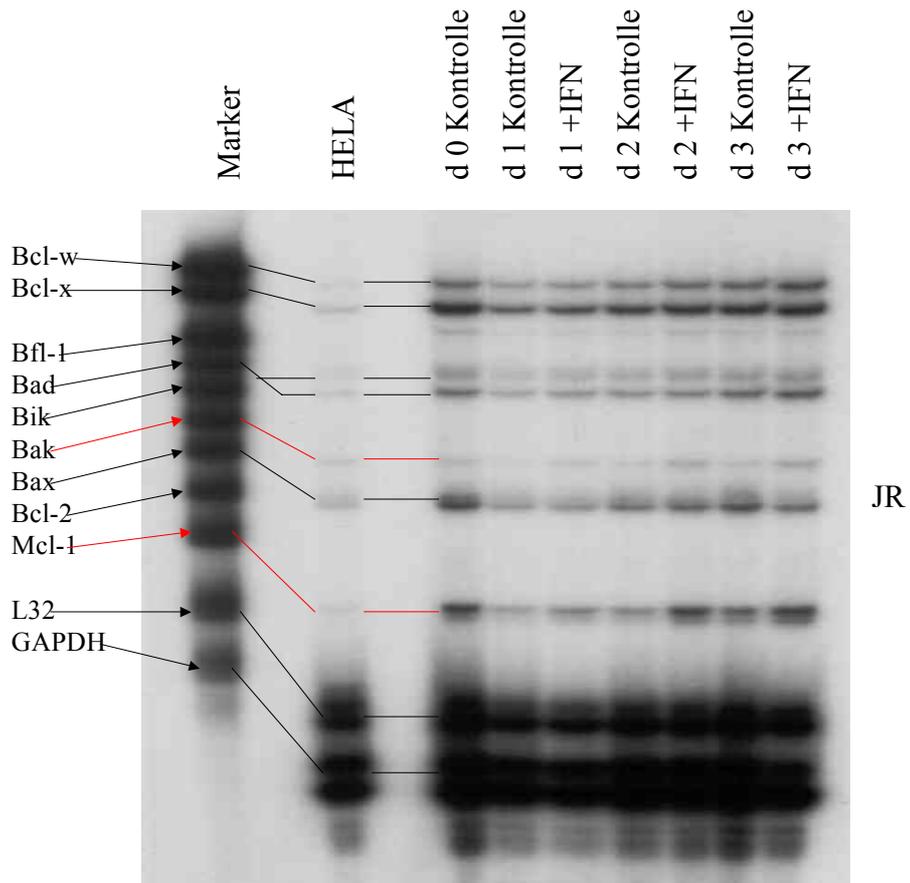


Abb. 3.18: Expression der Caspasen bei den Zelllinien A4573 (A), JR (B), TC32 (C) und TC71 (D) jeweils nach 24, 48 oder 72 Stunden IFN- γ -Behandlung mit Kontrollen. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle. Aufgrund von technischen Schwierigkeiten mussten die beiden Proben für Tag 3 bei A4573 wiederholt werden, was in A zu einer leichten Verschiebung der Banden führt. Rote Pfeile bezeichnen die Banden für Proteine, die hochreguliert werden und blaue Pfeile die Banden für Proteine, die durch IFN- γ herunterreguliert werden.

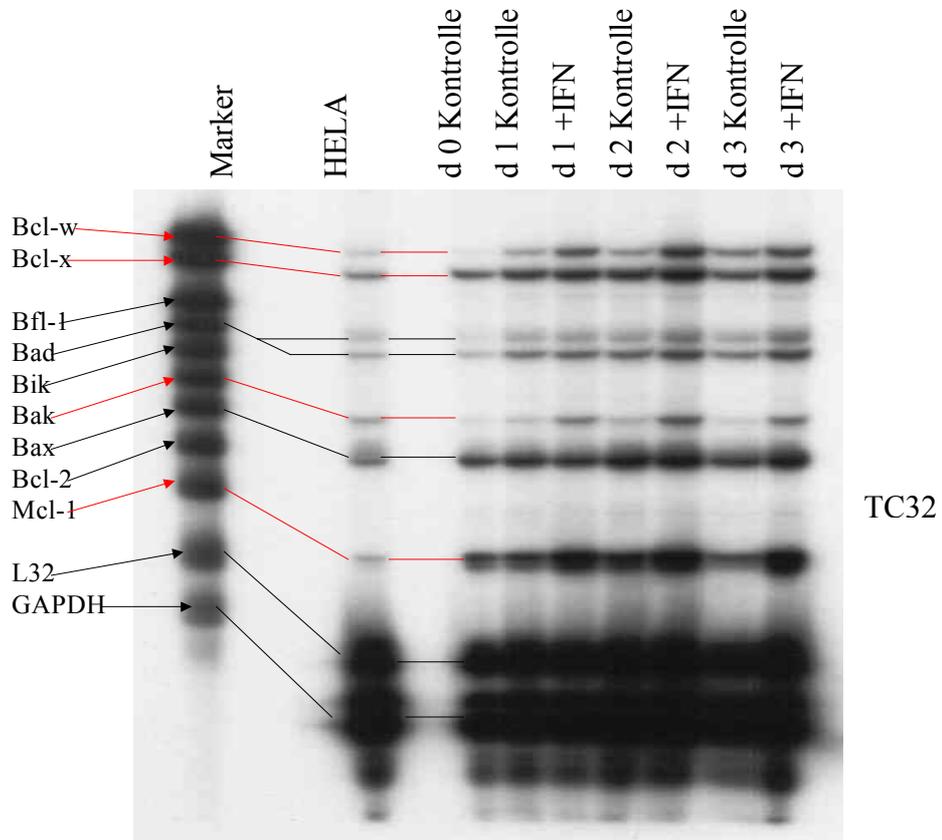
Hervorzuheben ist aus Abbildung 3.18 zum einen, die bereits in 3.4.1 erwähnte, deutlich verstärkte Expression von Caspase-8 durch Behandlung mit IFN- γ , vor allem bei den Zelllinien A4573 und JR, aber auch bei TC71. Zum anderen wird in allen vier Zelllinien Caspase-1 induziert sowie die Expression Caspase-7 leicht verstärkt. Bei A4573, JR und TC71 wird die Caspase-4 hochreguliert. Darüber hinaus kommt es bei TC71 und A4573 ab Tag 2 zu einer leichten Verminderung der Caspase-2 Expression bei den IFN-behandelten Proben.

Bei Caspase-1 handelt es sich wahrscheinlich um eine Vermittlercaspase zwischen den Effektor- und den Initiatorcaspasen. Die genaue Funktion ist noch nicht bekannt, man weiß allerdings, dass ihre Funktion innerhalb der Apoptosekaskade von anderen Caspasen übernommen werden kann, sie also keine essentielle Bedeutung für diesen Signalweg hat. Da Caspase-1 nicht nur bei den beiden

B



C



D

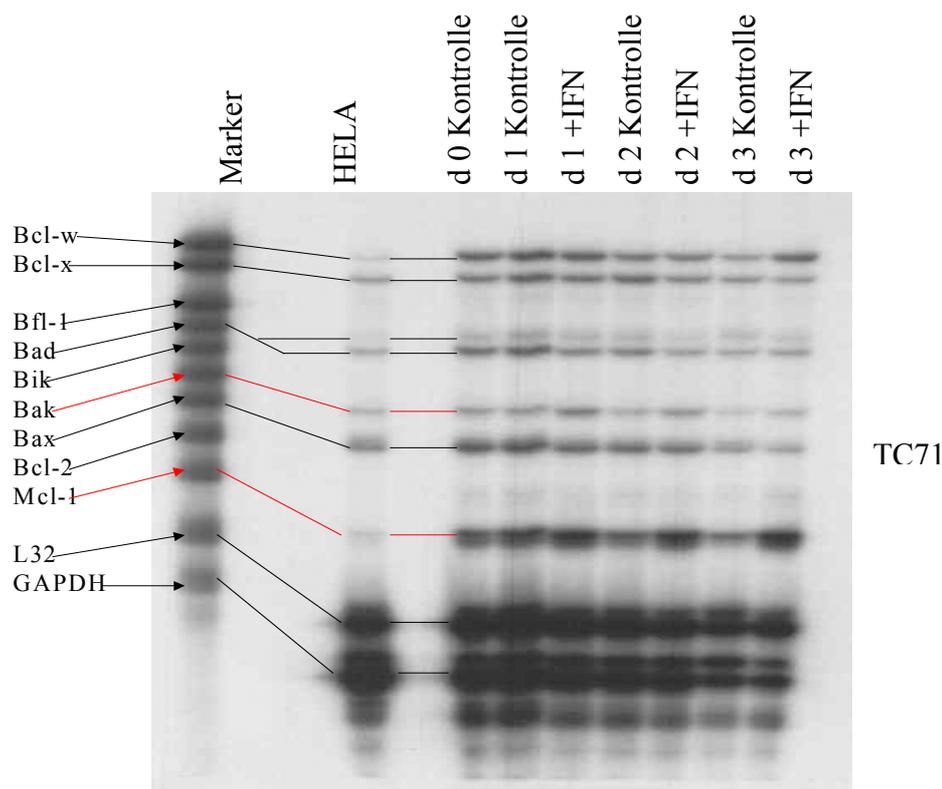


Abb. 3.19: Expression der Bcl-2 Familie bei den Zelllinien A4573 (A), JR (B), TC32 (C) und TC71 (D) jeweils nach 24, 48 oder 72 Stunden IFN- γ Behandlung mit Kontrollen. Als Marker dient unverdaute anti-sense RNA. Hela RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle. Rote Pfeile bezeichnen die Banden für Proteine, die hochreguliert werden und blaue Pfeile die Banden für Proteine, die durch IFN- γ herunterreguliert werden.

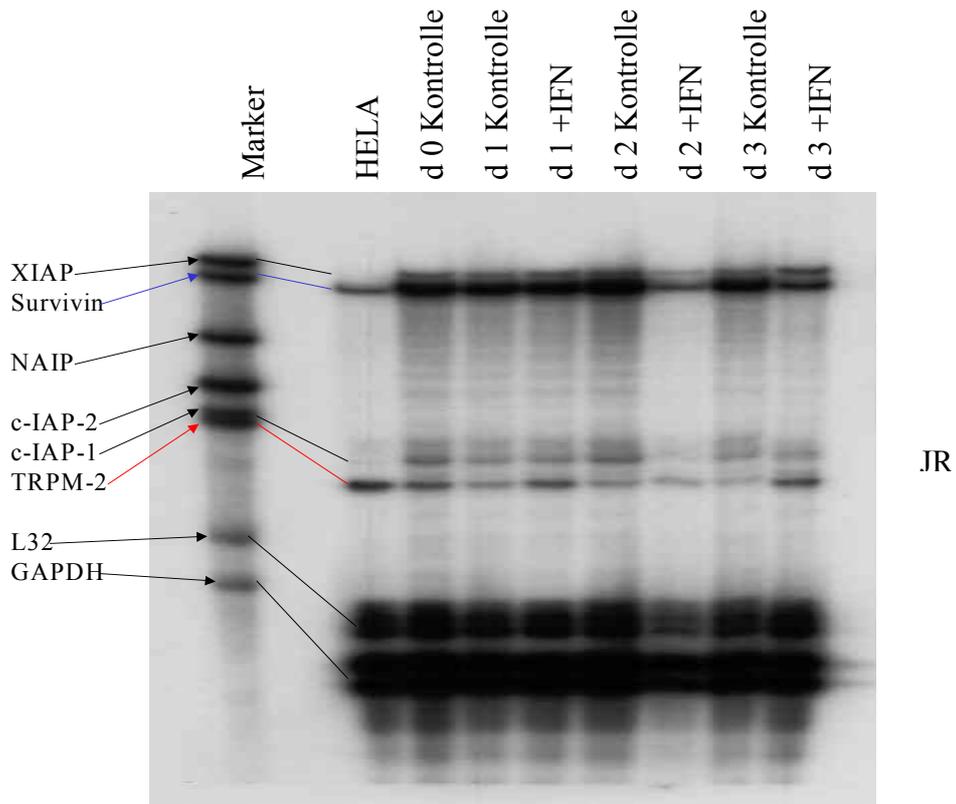
In Abbildung 3.19 zeigt sich eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Mcl-1 in allen vier Zelllinien sowie bei JR, TC32 und TC71 eine vermehrte Expression des proapoptotischen Bak als Folge von IFN- γ Behandlung. Bei A4573 und TC32 ist darüber hinaus ein verstärktes Signal für Bcl-w zu erkennen und bei TC32 zusätzlich für Bcl-x.

Bei Mcl-1, Bcl-w und Bcl-x handelt es sich interessanterweise um Mitglieder der anti-apoptotischen Subfamilie der Bcl-2 Familie, deren Regulation allerdings für das Überleben dieser Zellen keine entscheidende Rolle zu spielen scheint, zumindest nicht in Bezug auf den TRAIL-Signalweg.

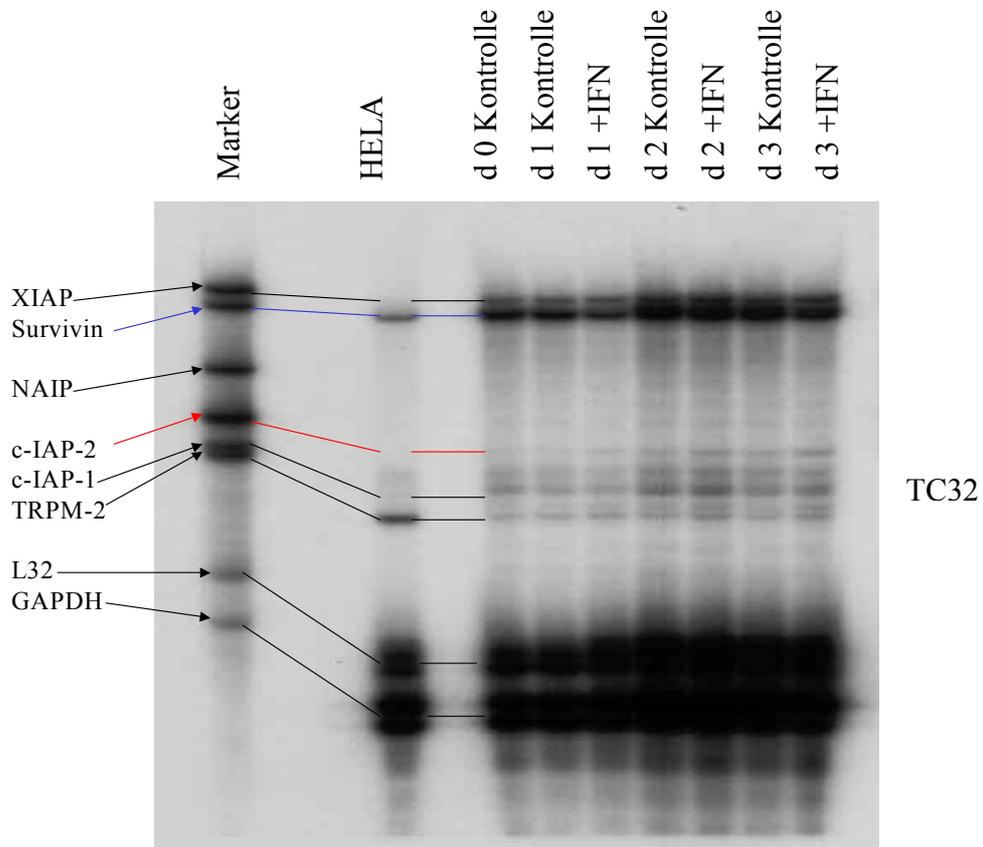
Lediglich Bak gehört zu den proapoptotischen Familienmitgliedern, aber, da es zum einen bei allen vier Zelllinien von vornherein exprimiert ist und zum anderen bei A4573 nicht durch IFN- γ Behandlung verstärkt wird, ist ein Zusammenhang dieses Proteins mit der Sensibilisierung der resistenten Zelllinien gegenüber TRAIL unwahrscheinlich.

Die beschriebenen Wirkungen von IFN- γ auf Mcl-1 und Bcl-x sind bereits aus Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen bekannt, ebenso die Hochregulation von Bak. Die Wirkung von IFN- γ auf Bcl-w ist bisher noch nicht beschrieben.

B



C



D

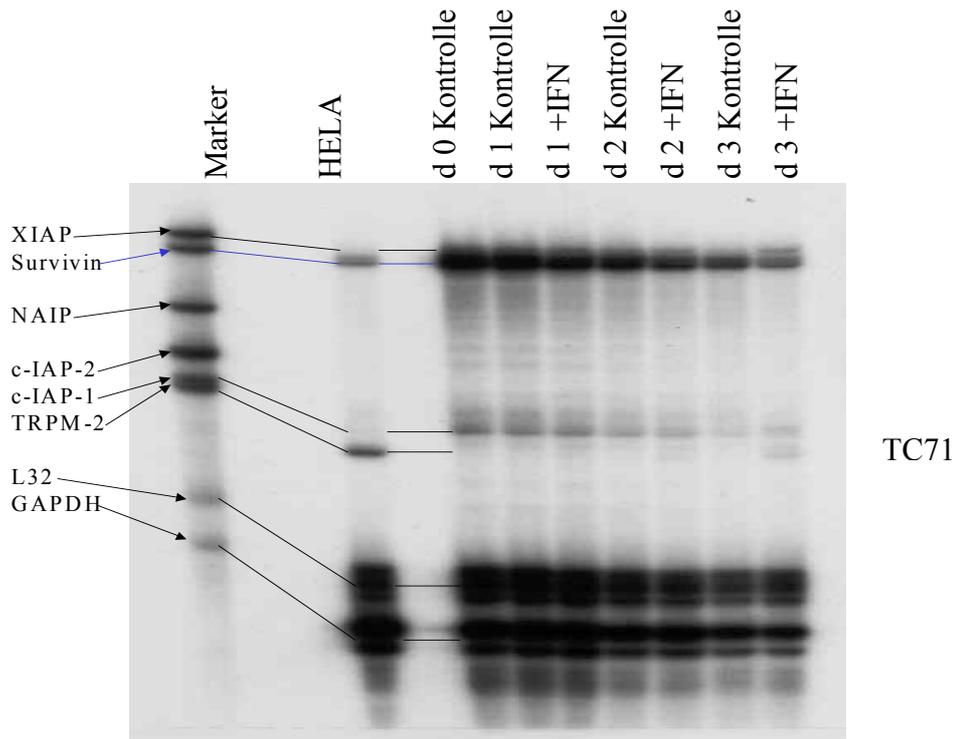


Abb. 3.20: Expression der IAP-Familie bei den Zelllinien A4573 (A), JR (B), TC32 (C) und TC71 (D) jeweils nach 24, 48 oder 72 Stunden IFN- γ Behandlung mit Kontrollen. Als Marker dient die unverdaute anti-sense RNA. Hela RNA wird als Kontrolle eingesetzt und die beiden Proteine L32 und GAPDH zur Ladekontrolle. Rote Pfeile bezeichnen die Banden für Proteine, die hochreguliert werden und blaue Pfeile die Banden für Proteine, die durch IFN- γ herunterreguliert werden.

In Abbildung 3.20 fällt nicht nur die verstärkte Expression von TRPM-2 bei A4573 und JR, sondern auch die Abschwächung des Signals für Survivin bei allen vier Zelllinien, sowie die verstärkte c-IAP-2 Expression bei den c-IAP-2 exprimierenden Zelllinien A4573 und TC32 als Folge von IFN- γ Behandlung auf.

Bei TRPM-2 (testosterone repressed prostate message 2), das deshalb interessant ist, weil es nur bei den beiden resistenten Zelllinien durch IFN- γ Behandlung deutlich verstärkt exprimiert wird, handelt es sich unter anderem um einen frühen Indikator für programmierten Zelltod. Es scheint sich also eher um ein Protein zu handeln, das die apoptosesteigernde Wirkung von IFN- γ anzeigt, als dass es für die Sensibilisierung von A4573 und JR gegenüber TRAIL verantwortlich zu machen wäre. Dafür spricht auch, dass es auch bei TC71 fehlt und keine Konsequenz zu haben scheint.

Die Verminderung der Survivin Expression, eines Apoptoseinhibitors, bei allen vier Zelllinien ist ebenfalls mit der allgemein apoptosefördernden Wirkung von IFN- γ am ehesten in Einklang zu bringen. Eine Regulation von Survivin durch IFN- γ ist bisher nicht beschrieben worden.

3.4.2.4 Zusammenfassung der Veränderungen in der Apoptosekaskade durch IFN- γ

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Effekt von IFN- γ auf die verschiedenen Proteine, die mit der Apoptosekaskade in Zusammenhang stehen (Tabelle 3.1).

	A4573	JR	TC32	TC71
Caspase-1	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Caspase-2	↓	=	=	↓
Caspase-3	=	=	=	=
Caspase-4	↑	↑	=	↑
Caspase-5	∅	∅	∅	∅
Caspase-6	=	=	=	=
Caspase-7	↑	↑	↑	↑
Caspase-8	↑↑	↑↑	↑*	↑
Caspase-9	n. beurteilbar	n. beurteilbar	n. beurteilbar	n. beurteilbar
Caspase-10a	∅	∅	∅	=
Bcl-w	↑	=	↑	=
Bcl-x	=	=	↑	=
Bfl 1	∅	∅	∅	∅
Bad	=	=	=	=
Bik	∅	∅	∅	∅
Bak	=	↑	↑	↑
Bax	=	=	=	=
Bcl-2	∅	∅	∅	∅
Mcl-1	↑	↑	↑	↑
FASL	∅	∅	∅	∅
FAS	=	↓	=	↑↑
DcR1	=	=	=	↑↑
DR3	=	=	=	=
DR5	=	=	=	↑
DR4	↓	=	=	↓
TRAIL	↑↑	↑↑	=	↑↑
TNFRp55	=	∅	=	↑
TRADD	=	=	=	=
RIP	=	=	=	=
XIAP	=	=	=	=
Survivin	↓	↓	↓	↓
NAIP	∅	∅	∅	∅
c-IAP-1	=	=	=	=
c-IAP-2	↑	∅	↑	∅
TRPM-2	↑	↑	=	∅

Tabelle 3.1: Überblick über die IFN- γ induzierten Proteinveränderungen bezogen auf die Apoptosekaskade für die ES-Zelllinien A4573, JR, TC32 und TC71. (↑↑ - starke Hochregulation, vorher nicht oder geringgradig exprimiert, ↑ - Hochregulation, ↓- Herunterregulation, = - unverändert, ∅ – nicht vorhanden) Wesentliche Veränderungen sind grau unterlegt. *nur in der DNA-Vorlage für die Todesrezeptorengruppe nachzuweisen

3.4.3 Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspase-8 Inhibitor nach Sensibilisierung mit IFN- γ

Um nun abschließend zu zeigen, dass in den resistenten Zelllinien A4573 und JR der Caspase-8 tatsächlich eine tragende Rolle in der Apoptosevermittlung durch TRAIL zukommt, wird der Versuch aus 3.2.5 nach IFN- γ -Inkubation exemplarisch mit A4573 durchgeführt.

Dazu erfolgt zunächst eine 60-stündige Inkubation der Zellen mit IFN- γ (Endkonzentration 2000 IU/ml). Anschließend werden sie wie in 3.2.5 beschrieben mit dem Caspase-8-Inhibitor (z-IETD-FMK) beziehungsweise dem PanCaspasen-Inhibitor (z-VAD-FMK) für 30 Minuten vorinkubiert, um für weitere 24 Stunden mit TRAIL (Endkonzentration: 100 ng/ml) behandelt zu werden. Der Anteil apoptotischer Kerne wird durchflusszytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. bestimmt.

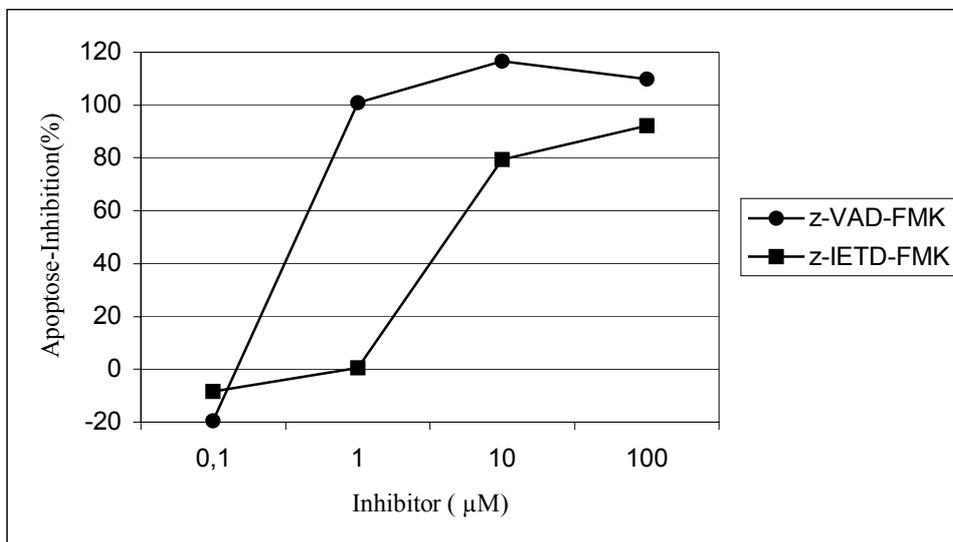


Abb. 3.21: Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspase-8 Inhibitor (z-IETD-FMK) nach IFN- γ Inkubation bei A4573. Zusätzlich Kontrolle der möglichen Apoptoseinhibition mit dem PanCaspasen-Inhibitor (z-VAD-FMK). Der Anteil apoptotischer Kerne wurde durchflusszytometrisch nach der Methode von Nicoletti et al. bestimmt.

In Abbildung 3.21 zeigt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 3.13. Das heißt, dass sich durch Inhibition der durch IFN- γ hochregulierten Caspase-8 tatsächlich die Apoptose, die nach IFN- γ Vorinkubation infolge von TRAIL-Behandlung bei den vorher resistenten Zelllinien zu sehen ist, inhibieren lässt. Die Wirkung der Caspase-8 Inhibition entspricht hier der Caspase-8 Inhibition bei den von vornherein sensiblen Zelllinien RD-ES und TC32.

Damit muss abschließend davon ausgegangen werden, dass die Hochregulation von Caspase-8 notwendig ist für Sensibilisierung der beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR durch IFN- γ gegenüber TRAIL-Behandlung.

4 Diskussion

4.1. Zusammenfassung der wesentlichen experimentellen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass ES Zellen auf TRAIL-vermittelte Apoptose äußerst sensibel ansprechen. Von den neun untersuchten ES Zelllinien waren nur zwei gegenüber TRAIL resistent. Die Untersuchung der Resistenzursache bei den beiden nicht sensiblen Zelllinien zeigte, dass diese die Caspase-8 im Vergleich zu den sensiblen Zelllinien nur minimal exprimieren. Durch IFN- γ lassen sich die resistenten Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibilisieren, was mit einer Hochregulation von Caspase-8, eines wesentlichen Elements der die TRAIL-Wirkung vermittelnden Apoptosekaskade, einhergeht.

4.2 Wirkung von TRAIL auf ES Zelllinien

Die apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL ist seit der Erstbeschreibung dieses neuen Mitgliedes der TNF Ligandenfamilie 1995 in verschiedenen Tumorzelllinien und im Mausversuch gezeigt worden. Immer wieder wurde beschrieben, dass malignes Gewebe sehr gut auf TRAIL ansprach, sich gesundes Gewebe dagegen als resistent erwies (Marsters et al. 1996, Walczak et al. 1999, Wiley et al. 1995, Rieger et al. 1998, Keane et al. 1999, French u. Tschopp 1999).

Um den möglichen therapeutischen Nutzen von TRAIL für die Behandlung des Ewing-Sarkoms einschätzen zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst die Wirkung von TRAIL auf Zelllinien *in vitro* untersucht. Von den getesteten neun Zelllinien erwiesen sich sieben gegenüber der apoptoseinduzierenden Wirkung von TRAIL sensibel (Abb. 3.1). Dieses Ergebnis entspricht dem anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Mehrzahl ihrer ES Zelllinien durch TRAIL Behandlung apoptotisch wurde (Van Valen et al. 2000, Kumar et al. 2001, Mitsiades et al. 2001).

Diese Erkenntnis legt nahe, dass TRAIL auch *in vivo* von therapeutischem Nutzen in der Behandlung des Ewing-Sarkoms sein könnte.

4.3 Resistenzmechanismen

Die Gründe für TRAIL-Resistenz werden in verschiedenen Artikeln kontrovers diskutiert. Diese Tatsache wurde in der vorliegenden Arbeit zum Anlass genommen, die unterschiedlichen von anderen Arbeitsgruppen beobachteten Resistenzmechanismen für die hier untersuchten resistenten Zelllinien zu überprüfen.

4.3.1 Regulation der TRAIL-Wirkung durch unterschiedliche Expression von TRAIL-Rezeptoren

Die weite Verbreitung von TRAIL-Expression (Wiley et al. 1995) legte schon früh die Vermutung nahe, dass der Grund für TRAIL-Resistenz in der unterschiedlichen Expression von TRAIL-Rezeptoren zu finden sein müsse. Die Komplexität dieser Vorstellung erhöhte sich immens als statt einem, vier Rezeptoren für TRAIL identifiziert wurden.

Da nur über zwei der vier Rezeptoren Apoptose induziert werden kann, stellte man die Hypothese auf, dass das Vorhandensein der beiden in Bezug auf Apoptoseauslösung nicht-funktionellen Rezeptoren im Sinne einer kompetitiven Inhibition die Apoptosevermittlung über die beiden funktionellen Rezeptoren inhibieren würde. Untermuert wurde diese Vermutung dadurch, dass von den gleichen Arbeitsgruppen eine inverse Korrelation zwischen Expression dieser nicht-funktionellen Decoy Rezeptoren auf mRNA-Ebene und Sensibilität der von ihnen untersuchten Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose gefunden wurde (Pan et al. 1997, Sheridan et al. 1997, Marsters et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den hier untersuchten neun Ewing-Sarkom Zelllinien zum einen die mRNA Expression für drei der vier TRAIL-Rezeptoren im RNase Protektionsversuch und zum anderen die Oberflächenexpression der vier TRAIL-Rezeptoren mittels Durchflußzytometer untersucht und kein Zusammenhang zwischen Resistenz und Rezeptorexpression gefunden (Abb. 3.2).

Ebenfalls keine Korrelation zwischen der TRAIL-Rezeptorexpression auf mRNA Ebene und der Sensibilität von Zelllinien gegenüber TRAIL konnten zwei Arbeitsgruppen, die das Vorhandensein der vier TRAIL-Rezeptoren beim Melanom (Zhang et al. 1999, Griffith u. Lynch 1998), eine bei Brustkrebszelllinien (Keane et al. 1999) und eine ebenfalls beim Ewing-Sarkom (Mitsiades et al. 2001) untersucht haben, nachweisen. Ein Grund für die Divergenz dieser Untersuchungen zu denen von Pan, Sheridan und Marsters mag darin bestehen, dass sich unterschiedliche Zellarten zum einen in der Expression von TRAIL-Rezeptor mRNA, und zum anderen in ihrem Resistenzmechanismus gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose unterscheiden. Darüber hinaus kann von der TRAIL-Rezeptor mRNA Expression einer Zelle nicht zwangsläufig auf die Oberflächenrezeptorexpression geschlossen werden (Griffith u. Lynch 1998, Zhang et al. 1999). Allerdings zeigt sowohl die vorliegende Arbeit, wie auch eine Arbeit zum Melanom (Zhang et al. 1999), in denen aus dieser Überlegung heraus direkt auch durchflusszytometrisch die Oberflächenrezeptorexpression untersucht wurde, dass auf diesem Weg ebenfalls keine Korrelation zwischen Resistenz der Zellen und Expression der Decoy Rezeptoren hergestellt werden kann.

4.3.2 Regulation der TRAIL Wirkung durch inhibitorische Zellproteine sowie Mitglieder der Bcl-2 Familie

Eine weitere mögliche Resistenzursache von Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose ist die Überexpression von Apoptose-inhibierenden Zellproteinen.

FLIP (FLICE-inhibitory protein) gehört zu dieser Gruppe von Proteinen. Da es Strukturähnlichkeit besitzt mit ProCaspase-8, ist es in der Lage, mit dieser um die Bindung an das Adapterprotein FADD zu konkurrieren und so, da FLIP über kein aktives Zentrum verfügt, die Weitervermittlung des Apoptosesignals zu verhindern (Irmeler et al. 1997).

Eine Korrelation zwischen der Expression von FLIP auf Proteinebene und der Sensibilität von Zelllinien gegenüber TRAIL- beziehungsweise Fas-vermittelter Apoptose wurde für Melanomzellen gezeigt (Irmeler et al. 1997, Griffith et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein von FLIP bei den neun Ewing-Sarkom Zelllinien im Western Blot untersucht und kein Unterschied in der FLIP Expression zwischen sensiblen und resistenten Zelllinien festgestellt (Abb. 3.3).

Ebenfalls keine Korrelation zwischen FLIP-Expression und Resistenz konnten eine Arbeitsgruppe für das Melanom (Zhang et al. 1999) und eine weitere für das Ewing-Sarkom (Mitsiades et al. 2001) herstellen. Es scheint sich also auch hier um keinen generellen Resistenzfaktor zu handeln.

Die Gruppe der inhibitorischen Zellproteine umfasst darüber hinaus die IAP(Inhibitor of Apoptosis Proteins)–Familie, zu der die fünf Proteine XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP und Survivin gehören.

Sowohl von der Expression von Survivin (Grossmann et al. 1999, Sarela et al. 2000), als auch von der Expression der Proteine XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 (Tamm et al. 2000) konnte auf die Prognose von Tumoren geschlossen werden.

Da NAIP in einem Großteil von Tumorzelllinien a priori nicht exprimiert wird (Tamm et al. 2000), scheint dieses Protein, obwohl ebenfalls in der Lage Apoptose zu inhibieren, in diesem Zusammenhang eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Untersuchung der Expression der mRNA der IAP-Familien Proteine bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ergab ein heterogenes Expressionsmuster in Bezug auf XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 und Survivin und ein Fehlen von NAIP bei allen neun Zelllinien (Abb. 3.11).

Dies entspricht dem Muster, das auch in einer Reihe anderer Tumorzelllinien nachgewiesen wurde (Tamm et al. 2000).

Auf den ersten Blick ergibt sich damit kein neuer Hinweis auf die Resistenzursache bei den beiden Zelllinien A4573 und JR. In Bezug auf die untersuchten Proteine X-IAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 muss diese Aussage allerdings eingeschränkt werden, da bei diesen Proteinen keine Korrelation zwischen mRNA Expression und Proteinexpression zu bestehen scheint (Tamm et al. 2000) und somit erst eine Proteinanalyse zum Beispiel mittels Western Blot eine endgültige Aussage erlauben

würde. Bei Survivin allerdings kann von dieser Korrelation ausgegangen werden (Sarela et al. 2000).

Ergänzt wird die Gruppe der bezüglich Apoptose relevanten Zellproteine durch die Bcl-2 Familie. Hierzu gehören die anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 und Bfl-1, sowie die pro-apoptotischen Mitglieder Bax, Bak, Bik, Blk, Bad, Bid und Bok. Die Balance zwischen der Expression pro- und anti-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder entscheidet über den Einfluss, der von dieser Proteinfamilie auf den Apoptoseprozeß ausgeht.

Obwohl eine Bedeutung der Bcl-2 Familienmitglieder für den Apoptoseprozess unumstritten ist (Cory et al. 1995, Strasser et al. 1997, Yang et al. 1996, Chao et al. 1998), ist bis heute der genaue Wirkmechanismus nur zum Teil bekannt. Es konnte bisher keine Korrelation zwischen der Expression einzelner Mitglieder dieser Unterfamilien und der Prognose von Tumoren beziehungsweise ihrer Resistenz oder Sensibilität gegenüber apoptoseinduzierenden Faktoren hergestellt werden.

Auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten neun ES Zelllinien ließ sich kein Zusammenhang zwischen Resistenz von Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose und Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Unterfamilien finden (Abb. 3.7).

4.3.3 Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Caspasen?

Die Caspasen nehmen im Rahmen einer Kaskade das Apoptosesignal unter anderem an Adapterproteinen der Todesrezeptoren auf und setzen es aktiv in den apoptotischen Zerfall der Zelle um.

Bei der insgesamt heterogenen Expression der untersuchten Caspasen in den neun Ewing-Sarkom Zelllinien galt den Caspasen besondere Beachtung, die bekanntermaßen an der Apoptosevermittlung durch TRAIL beteiligt sind. Dies sind zum einen die Initiatorcaspase-8 und zum anderen die Effektorcaspasen -3, -6 und -7.

Es zeigte sich auf mRNA Ebene ein stark abgeschwächtes Signal für Caspase-8 bei den beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR, während Caspase-8 mRNA bei allen anderen Zelllinien deutlich exprimiert wurde (Abb. 3.5). Da es sich bei Caspase-8 um ein essentielles Protein in der Apoptosevermittlungskaskade durch TRAIL handelt, wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von Caspase-8 genauer untersucht.

Mit Hilfe eines Western Blots konnte gezeigt werden, dass mRNA- und Proteinexpression für Caspase-8 korrelieren. Während die sieben TRAIL-sensitiven Zelllinien deutlich Caspase-8 exprimierten, zeigte sich bei den beiden resistenten Zelllinien nur ein sehr schwaches Signal für Caspase-8 (Abb. 3.12).

Die funktionelle Bedeutung von Caspase-8 wurde darüber hinaus mit Hilfe eines Caspase-8 Inhibitions-Versuchs unterstrichen. Inhibition der Caspase-8 ging in diesem Versuch (3.2.5) mit einer fast vollständigen Blockade der Apoptose durch TRAIL einher.

Damit könnte Caspase-8 der Faktor sein, dessen Fehlen für die Resistenz der hier untersuchten Ewing-Sarkom Zelllinien verantwortlich ist.

Fehlen von Caspase-8 ist vor kurzem auch in anderen Veröffentlichungen als ursächlich für TRAIL-Resistenz beim Neuroblastom und bei primitiven neuroektodermalen Hirntumoren (PNET) (Hopkins-Donaldson et al. 2000, Grotzer et al. 2000, Eggert et al. 2000, Teitz et al. 2000) beschrieben worden.

4.4 Wirkung von IFN- γ auf die neun ES Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung einer kombinierten Behandlung aus IFN- γ und TRAIL bei Ewing-Sarkom Zelllinien untersucht.

Begründet war dies durch Veröffentlichungen, die einen Synergismus von TNF/Fas und IFN- γ Wirkung zeigen (Tsujimoto et al. 1986, Fransen et al. 1986, Brouckaert et al. 1986, Yonehara et al. 1989, Van Valen et al. 1993, Weller et al. 1994, Kontny et al. 1998), und anderen, die die Modulierung der TRAIL-Rezeptorexpression durch IFN- γ in der antiviralen Therapie beschreiben (Sedger et al. 1999), sowie vor allem durch eine Veröffentlichung, in der die Sensibilisierung von resistenten Colocarzinomzellen gegenüber pro-apoptotischen Stimuli mittels IFN- γ beschrieben wird (Ossina et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich auch resistente Ewing-Sarkom Zelllinien mit Hilfe von IFN- γ zumindest gegenüber TRAIL als pro-apoptotischen Stimulus sensibilisieren lassen (Abb. 3.14).

Da die Wirkung von IFN- γ über die Expression neuer Genprodukte vermittelt wird (Sen u. Ransohoff 1993), stellt sich zwangsläufig die Frage, welche Genprodukte für die beobachtete Sensibilisierung von Ewing-Sarkom Zelllinien gegenüber TRAIL verantwortlich sein könnten.

4.5 Veränderungen möglicher Resistenzmechanismen durch IFN- γ

4.5.1 Caspase-8

Da Caspase-8 der einzige Faktor war, durch dessen Fehlen sich die beiden resistenten Ewing-Sarkom Zelllinien A4573 und JR in dieser Arbeit auszeichneten, war es dieses Protein, dem in Bezug auf Veränderungen durch IFN- γ das Hauptaugenmerk galt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene eine IFN- γ induzierte Hochregulation der Caspase-8 nachweisen lässt (Abb. 3.15 und Abb. 3.17).

Betrachtet man dies gemeinsam mit der beobachteten Sensibilisierung der beiden resistenten Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose durch IFN- γ (Abb. 3.14) und dem Funktionstest aus 3.4.3, in dem sich eine fast komplette Blockade der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Inhibition der hochregulierten Caspase-8 zeigen lässt, muss der Schluss gezogen werden, dass Caspase-8 zumindest ein für die Resistenz von A4573 und JR verantwortlicher Faktor ist.

4.5.2 Beeinflussung anderer möglicher Resistenzmechanismen durch IFN- γ

Da die Apoptoseregulation ein sehr komplexes System von interagierenden Faktoren ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Resistenz, beziehungsweise Sensibilisierung von Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose neben der Caspase-8 nicht auch durch weitere apoptoserelevante Gene reguliert wird. Die in dieser Arbeit ermittelten IFN- γ bedingten Veränderungen der mRNA Expression verschiedener apoptoseassoziiierter Proteine wird nun in Anlehnung an den Abschnitt 4.3 gegliedert, kurz diskutiert.

4.5.2.1 Veränderungen der TRAIL-Rezeptorexpression durch IFN- γ

Bei Zytomegalievirus-infizierten Zellen wurde beschrieben, dass durch IFN- γ zum einen TRAIL in geringem Maße sowohl auf mRNA Ebene, als auch als Oberflächenprotein hochreguliert wird, und zum anderen die Expression der TRAIL-Rezeptoren so moduliert wird, dass die Zellen sensibler gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose werden. Auf mRNA Ebene zeigt sich in der erwähnten Arbeit eine Herunterregulation der TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R3 und -R4 sowohl in infizierten, als auch in nicht infizierten Zellen und eine Hochregulation von TRAIL-R1 und -R2, den beiden Todesdomänen enthaltenden Rezeptoren in infizierten Zellen (Sedger et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich auf mRNA Ebene eine Hochregulation der TRAIL-Expression bei A4573, JR und TC71 zeigen, eine Modulation der TRAIL-Rezeptorexpression im Sinne einer Sensibilisierung gegenüber TRAIL jedoch für keine der vier Zelllinien (Abb. 3.15 und Abb. 3.16). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit denen anderer Arbeitsgruppen, die IFN- γ in Tumorzellen untersucht haben (Shin et al. 2001a).

Bei der Hochregulation von TRAIL durch IFN- γ , die auch in anderen Arbeiten beschrieben ist (Sedger et al. 1999, Shin et al. 2001a, Kumar-Sinha et al. 2001), handelt es sich um ein interessantes Phänomen. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Hochregulation in Ewing-Sarkom Zellen wie in Zytomegalievirus-infizierten Fibroblasten und B-Zell-Lymphom Zellen stattfindet,

dass heisst auf der Zelloberfläche nachvollziehbar ist (Sedger et al. 1999, Oshima et al. 2001) und eventuell sogar TRAIL von den Zellen sekretiert wird (Oshima et al. 2001).

Da Ewing-Sarkom Zellen nachweislich über TRAIL-Rezeptoren verfügen, müsste man annehmen, dass im Rahmen eines auto-/ parakrinen Mechanismus Apoptose induziert wird. Damit wäre möglicherweise eine Erklärung für die allein durch IFN- γ Inkubation gesteigerte Apoptoserate gefunden (vergleiche Abb. 3.1 und Abb. 3.14).

Zur endgültigen Klärung dieser Hypothese wären allerdings weitere Versuche erforderlich, wie zum Beispiel die Inhibition von TRAIL nach IFN- γ -Behandlung durch einen selektiven TRAIL-Inhibitor, die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von TRAIL und ein ELISA um eine mögliche Sekretion von TRAIL in das Kulturmedium nachzuweisen.

Von zwei Arbeitsgruppen konnte ein solcher auto-/ parakriner Mechanismus bereits nachgewiesen werden, zum einen für IFN- γ in Leberzellkarzinomzellen (Shin et al. 2001a) und zum anderen für IFN- α in B-Zell-Lymphomzellen (Oshima et al. 2001).

4.5.2.2 Veränderung der Expression von inhibitorischen Zellproteinen sowie der Bcl-2 Familie durch IFN- γ

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Ewing-Sarkom Zelllinien kommt es innerhalb der IAP-Familie lediglich bei Survivin zu erwähnenswerten Veränderungen durch IFN- γ .

Bei den Zelllinien A4573, JR und TC71 wird die mRNA Expression dieses Proteins herunterreguliert (Abb. 3.19).

Survivin wurde bisher in verschiedenen Arbeiten als apoptoseinhibierender Faktor beschrieben, dessen Vorhandensein in Tumoren mit deren Prognose korrelierbar ist (Grossmann et al. 1999, Sarela et al. 2000). Eine Herunterregulation der mRNA dieses Proteins durch IFN- γ wird in dieser Arbeit erstmals gezeigt.

Zu dem Schluss, dass es sich bei Survivin nicht um den allein über TRAIL-Sensibilität entscheidenden Faktor handelt, kommt man, wenn man in Erwägung zieht, dass Survivin in allen neun untersuchten Zelllinien von vornherein nachweisbar ist (Abb. 3.11).

Es bleibt noch nachzuprüfen, ob die Herunterregulation von Survivin-mRNA auf der posttranslationalen Ebene mit der Proteinexpression korreliert.

Innerhalb der anti-apoptotischen Unterfamilie, der Bcl-2 Familie, kommt es bei allen vier untersuchten Zelllinien zu einer Hochregulation von Mcl-1. Dieser Effekt von IFN- γ ist bereits aus anderen Veröffentlichungen bekannt (Ossina et al. 1997, Druilhe et al. 1998).

Zieht man die Tatsache in Betracht, dass es sich hier um ein apoptoseinhibitorisches Protein handelt, das hochreguliert wird, und bedenkt weiterhin, dass die Zellen trotzdem sensibler

gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose werden, muss man davon ausgehen, dass diesem Protein keine entscheidende Rolle in dem hier untersuchten Apoptosesignalweg zukommt.

Was die pro-apoptotische Unterfamilie der Bcl-2 Familie betrifft, so zeigte sich eine Hochregulation von Bak bei JR, TC32 und TC71 (Abb. 3.19). Auch diese IFN- γ Wirkung ist bereits aus anderen Veröffentlichungen bekannt (Ossina et al. 1997, Pammer et al. 1999). Sie ist mit der allgemeinen Apoptosesteigerung durch IFN- γ durchaus in Einklang zu bringen. Da die Hochregulation von Bak allerdings bei A4573 nicht vorkommt, scheint sie nicht wesentlich an der Sensibilisierung gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose beteiligt zu sein.

4.5.2.3 Veränderung anderer apoptoseassoziiierter Proteine durch IFN- γ

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass IFN- γ TRPM-2 (Clusterin / GP80 / SP40,40 / Apolipoprotein J) hochreguliert und zwar, von den vier untersuchten Zelllinien, nur bei den beiden resistenten, A4573 und JR (Abb. 3.19). Bei den beiden sensiblen Zelllinien ist dieser Faktor von vornherein nicht beziehungsweise nur minimal vorhanden, dafür allerdings bei drei der fünf nicht mit IFN- γ stimulierten sensiblen Zelllinien (Abb. 3.18 und Abb. 3.11).

In Verbindung mit der Komplementkaskade ist die Hochregulation von TRPM-2 durch IFN- γ bereits beschrieben worden (Berge et al. 1997, Gasque et al. 1995). Induktion der TRPM-2 Expression wird in Zusammenhang mit Apoptose und ganz allgemein mit Regression und Untergang von Zellsystemen beschrieben (Kerr et al. 1994, Buttyan et al. 1989).

Die genaue Funktion von TRPM-2 ist bisher nicht bekannt. Es könnte prinzipiell mit der Sensibilisierung der beiden Zelllinien A4573 und JR in Zusammenhang stehen. Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, da dieses Protein wie bei anderen Zelllinien, die sensibel gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind, ebenfalls bei A4573 und JR a priori exprimiert ist.

Eine Rolle, die für TRPM-2 vorgeschlagen wurde, ist die eines sekretorischen Chaperone-Proteins, das bei verschiedenen Arten von Zellstress freigesetzt wird (Wilson u. Easterbrook-Smith 2000). Diese Vorstellung wäre mit dem bei A4573 und JR beobachteten Phänomen der Hochregulation gut in Einklang zu bringen.

Es wurden weiterhin andere Mitglieder der Caspasen Familie in den, in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien durch IFN- γ in ihrer Expression moduliert. Es kommt bei allen vier Zelllinien zu einer Induktion von Caspase-1 und einer Hochregulation von Caspase-7 sowie bei A4573, JR und TC71 zu einer Hochregulation von Caspase-4 (Abb. 3.18). Die Hochregulation der Caspase-1 durch IFN- γ wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zellsystemen beschrieben (Keane et al. 1996, Stephanou et al. 2000, Detjen et al. 2001). Caspase-1 wurde in Bezug auf Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose bei Brustkrebszelllinien als entscheidender Resistenzfaktor beschrieben (Keane et al. 1996). Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten ES-Zelllinien ist dies

unwahrscheinlich, da auch den meisten sensiblen Zelllinien die Expression von Caspase-1 mRNA vor IFN- γ Inkubation fehlt (Abb. 3.5). Eine entscheidende Rolle von Caspase-1 in Fas-vermittelter Apoptose, die sich mit TRAIL einen ähnlichen Signalweg teilt, konnte von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen in hämatopoetischen Progenitorzellen von Fanconi Anämie Patienten, sowie in neuronalen und peritonealen Zellen nicht bestätigt werden. Zwar wird Caspase-1 eine tragende Rolle im Entzündungsprozess zugewiesen, aber keine in der Apoptose von neuronalen und peritonealen Zellen (Rathburn et al. 2000, Miwa et al. 1998, Du et al. 1997).

Die gezeigte Hochregulation von Caspase-4 durch IFN- γ (Abb. 3.18) ist bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden (Ossina et al. 1997). Bei Caspase-4 handelt es sich vermutlich um eine Vermittlercaspase zwischen Caspase-8 und Caspase-3 (Kamada et al. 1997). Eine Hochregulation ist also durchaus mit der Apoptosesteigerung durch IFN- γ in Einklang zu bringen. Bei der hier ebenfalls hochregulierten Caspase-7 (Abb. 3.18) handelt es sich um eine Effektorcaspase. Ihre Hochregulation durch IFN- γ , beziehungsweise IFN- β ist beim Ewing-Sarkom und in anderen Zellsystemen beschrieben (Ossina et al. 1997, Sancéau et al. 2000, Kumar-Sinha et al. 2001). Als Teil der apoptosevermittelnden Kaskade lässt sich auch die Regulation dieses Proteins gut mit der allgemeinen Apoptosesteigerung durch IFN- γ vereinbaren.

4.6 Konkrete Forschungsergebnisse dieser Arbeit

Es konnte in dieser Arbeit anhand von neun exemplarisch untersuchten Zelllinien gezeigt werden, dass Ewing-Sarkom-Zelllinien grundsätzlich durch TRAIL in Apoptose zu bringen sind. Voraussetzung dafür war die Expression von apoptosevermittelnden TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche dieser Zellen, die bei allen neun Zelllinien, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, nachweisbar war.

Zwei der untersuchten Ewing-Sarkom Zelllinien erwiesen sich gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose als resistent. Auf der Suche nach einem Resistenzmechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von apoptoseassoziierten Proteinen auf ihr Expressionsmuster hin untersucht. Dabei scheint Caspase-8, deren Expression bei den resistenten Zelllinien im Gegensatz zu den sensiblen Zelllinien nur minimal vorhanden ist, eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die hier gewonnene Erkenntnis, dass sich die beiden resistenten Zelllinien durch IFN- γ gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibilisieren lassen, und, dass dies mit einer deutlichen Induktion der Caspase-8 bei diesen Zelllinien einhergeht, unterstützt diese Vermutung.

Da in der Betrachtung weiterer durch IFN- γ Inkubation regulierter apoptoseassoziiierter Proteine zwar eine Reihe von möglicherweise ebenfalls Apoptose fördernden Faktoren gefunden wurde, aber keiner, der für die Sensibilisierung der resistenten Zelllinien in ähnlicher Weise verantwortlich

gemacht werden könnte, muss hier der Schluss gezogen werden, dass Caspase-8 der für die Resistenz von A4573 und JR entscheidende Faktor ist.

Es konnte zusätzlich durch Caspasen-Inhibition bestätigt werden, dass Apoptose durch TRAIL auf Caspase-8 als vermittelnden Faktor angewiesen ist, ähnlich wie Apoptose durch Fas.

4.7 Weiterführende Forschungsmöglichkeiten

Um das Bild der Resistenz durch Mangel an Caspase-8 zu vervollständigen, wäre eine Möglichkeit, Caspase-8 in die beiden resistenten Zellen zu transfizieren. Damit könnte man die Begleiteffekte von IFN- γ ausschalten und selektiv dieses Protein bezüglich seines Effektes auf Apoptosevermittlung durch TRAIL untersuchen.

Da das Gen für Caspase-8 auch in den resistenten Zelllinien vorhanden sein muss, weil es sonst auch nicht induzierbar wäre, stellt sich die Frage, auf welcher Ebene und wie die Transkription in mRNA inhibiert wird.

Es wurde beim Neuroblastom, für das ebenfalls eine Korrelation zwischen Mangel an Caspase-8 und TRAIL-Resistenz nachgewiesen werden konnte (Teitz et al. 2000, Hopkins-Donaldson et al. 2000, Eggert et al. 2000), gezeigt, dass die Promotorsequenz für Caspase-8 dort in einer hypermethylierten Form vorliegt (Teitz et al. 2000, Hopkins-Donaldson 2000). Dies ist ein, für eine Reihe von Tumorsuppressorgenen, bekannter Inaktivierungsmechanismus (Baylin et al. 1998, Whang et al. 1998).

Über die Applikation von demethylierenden Substanzen lässt sich diese Inaktivierung aufheben und im Falle von Caspase-8 eine Aufhebung der Resistenz gegenüber TRAIL erreichen. Dass dieser Mechanismus auch im Ewing-Sarkom von Bedeutung ist, konnte inzwischen gezeigt werden (Fulda et al. 2001).

Darüber hinaus interessiert der Weg, über den IFN- γ in der Lage ist, die hier beschriebene Proteinmodulation, insbesondere die Hochregulation von Caspase-8, zu induzieren. Für die IFN- γ induzierte Hochregulation von Caspase-1 in Kardiomyozyten (Stephanou et al. 2000) und die IFN- β induzierte Hochregulation von Caspase-7 beim Ewing-Sarkom (Sanéceau et al. 2000) konnte gezeigt werden, dass ihnen vorausgehend Elemente des bekannten IFN-Signalweges hochreguliert werden. Dazu gehören die Phosphorylierung der Janus Kinasen und die Translokation des phosphorylierten Stat-1 Proteins in den Zellkern. Dort bindet Stat-1 an GAS (gamma activated site) –Elemente im Promoter IFN- γ regulierter Gene. Im Falle von Caspase-7 wird so zunächst IRF-1 (Interferon Regulatory Factor) hochreguliert und als Folge der IRF-1 Wirkung dann Caspase-7. Caspase-1 scheint direkt vermehrt transkribiert zu werden.

Es bleibt also zu zeigen, ob auch der Promotor von Caspase-8 ein GAS-Element besitzt und auf diesem Wege durch IFN- γ induziert wird.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für die Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie gezeigt werden konnte, dass über ihre vermittelten Signalwege Proteine reguliert werden, die an die GAS-Elemente des IRF-1 Promotors binden können und so ebenfalls IRF-1 induzieren können (Gupta et al. 1998). Dies könnte eine weitere Erklärung für den Synergismus von IFN- γ - und TRAIL-Wirkung darstellen.

Inwieweit Caspase-8 Mangel für die Resistenz von Tumoren *in vivo* von Bedeutung ist, würde zum Beispiel die Korrelation von Caspase-8 Expression in Primärtumoren mit deren Malignität *in vivo* erfordern. Dabei könnte sich Caspase-8 als durchaus brauchbarer Prognosefaktor erweisen, der ähnlich wie die N-myc-Genamplifikation beim Neuroblastom, eine Risikogruppenzuweisung für das Ewing-Sarkom und damit effizientere Therapieansätze erlauben würde.

Der klinische Einsatz von TRAIL erfordert weitere Studien zur potentiellen Toxizität, gerade in Anbetracht der Erfahrung mit TNF und Fas. Nach heutigem Erkenntnisstand wäre ein baldiger Einsatz in klinischen Studien wünschenswert. Was die Kombination von IFN- γ und TRAIL betrifft, so müsste zunächst auch im Tierversuch eine synergistische Wirkungsverstärkung der beiden Substanzen gezeigt werden. Es müsste zudem ausgeschlossen werden, dass es durch IFN- γ nicht zu einer Toxizitätserhöhung von TRAIL kommt, was zum Beispiel durch die in dieser Arbeit nachgewiesene Hochregulation von TRAIL durch IFN- γ denkbar wäre.

4.8 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRAIL eine neue Therapiemöglichkeit für das Ewing-Sarkom darstellen könnte.

Die Untersuchung der Resistenzursache bei zwei der neun Zelllinien ergab, dass ein Mangel an Caspase-8 beim Ewing-Sarkom mit Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose in Zusammenhang steht. Für das Ewing-Sarkom gibt es bisher kaum Prognosefaktoren zur Stratifizierung von Risikogruppen. Unter Umständen könnte hier in Caspase-8 ein neuer Prognosefaktor gefunden worden sein, so dass eine Caspase-8 Analyse in Zukunft vielleicht ermöglicht, Risikogruppen für das Ewing-Sarkom zu klassifizieren und sie dementsprechend einer effizienteren Therapie zuzuführen.

Ein weiterer in dieser Arbeit vorgestellter potentieller Prognosefaktor könnte Survivin sein.

Für den Fall, dass sich Caspase-8 als entscheidender Prognosefaktor herauskristallisieren sollte, besteht nun die Möglichkeit, über Gabe von IFN- γ oder demethylierenden Substanzen sowie möglicherweise über eine Gentherapie, die Translation von Caspase-8 zu ermöglichen und so bisher resistente Tumoren behandeln zu können.

Mit TRAIL könnte also nun endlich ein Todesligand gefunden sein, der die Prognose bisher kaum heilbarer Tumorerkrankungen verbessert. Wenn auch seine Wirkung alleine *in vivo* vielleicht nicht

ausreicht, so könnte doch im Rahmen einer Kombinationstherapie die Dosis der bisher üblichen Chemotherapeutika mit seiner Hilfe deutlich vermindert werden, was die, für die Patienten belastenden Nebenwirkungen reduzieren würde.

So könnte eine effizientere Chemotherapie in Zukunft aussehen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von den neun hier untersuchten Ewing-Sarkom Zelllinien A4573, CHP-100, JR, RD-ES, SB, SK-N-MC, TC32, TC71 und 5838, sieben gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibel, und zwei, A4573 und JR, resistent sind.

Auf der Suche nach Merkmalen, durch die sich sensible und resistente Zelllinien unterschieden, wurden die Expression der Oberflächenrezeptoren für TRAIL im Durchflusszytometer, die FLIP-Proteinexpression im Western Blot, sowie die mRNA Expression verschiedener apoptoseassoziiierter Proteine, darunter Caspasen, Bcl-2-Familie, Todesrezeptoren und IAP-Familie im RNase Protektionsversuch untersucht. Auffallend war dabei, dass sich die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR durch eine verminderte Expression von Caspase-8 auszeichneten; dies auch auf Proteinebene im Western Blot.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in sensitiven Zelllinien eine Inhibition der Caspase-8 durch einen spezifischen Inhibitor eine nahezu komplette Blockade der Apoptosevermittlung durch TRAIL zur Folge hatte.

Mittels IFN- γ -Behandlung ließen sich die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibilisieren.

Auf der Suche nach IFN- γ induzierten Veränderungen, die für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten, wurden exemplarisch zwei sensible Zelllinien TC32 und TC71, sowie die beiden resistenten Zelllinien A4573 und JR auf Modulation der Expression ihrer apoptoseassoziierten Proteine auf mRNA-Ebene im RNase Protektionsversuch untersucht. Dabei zeigte sich eine Induktion der Caspase-8 bei A4573 und JR, sowie bei TC71, die ebenfalls auf Proteinebene nachvollziehbar war.

IFN- γ modulierte darüber hinaus eine Reihe weiterer Proteine, darunter TRAIL, Caspase-1, Caspase-7, Caspase-4, Survivin, Mcl-1 und TRPM-2. Als essentielles Mitglied der TRAIL induzierten Apoptosekaskade kommt die Caspase-8 als entscheidender Faktor für die beobachtete Sensibilisierung der resistenten Zelllinien gegenüber TRAIL in Frage. Untermuert wurde dies durch die Tatsache, dass sich durch Inhibition der hochregulierten Caspase-8 die Apoptosevermittlung durch TRAIL blockieren lässt.

Dieser Arbeit zufolge ist also Caspase-8 zum einen für die Resistenz, und zum anderen ihre Induktion durch IFN- γ für die Sensibilisierung von Ewing-Sarkom Zelllinien gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose verantwortlich.

6 Literaturverzeichnis

Adachi M., Watanabe-Fukunaga R., Nagata S. (1993) Aberrant transcription caused by the insertion of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1756-1760

Adams J. M., Cory S. (1998) The bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 281: 1322-1326

Ashkenazi A., Dixit V. M. (1998) Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281: 1305-1308

Ashkenazi A., Pai R. C., Fong S., Lemy S., Lawrence D. A., Marsters S., Blackie C., Chang L., McMurtrey A. E., Herbert A., DeForge L., Koumenis I., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Shahrokh Z., Shawdall R. (1999) Safety and antitumor-activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Inv* 104: 155-162

Baylin S. B., Herman J. G., Graff J. R., Vertino P. M., Issa P. (1998) Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Reg* 72: 141-196

Berge V., Johnson E., Hogasen K. (1997) Clusterin and the terminal complement pathway synthesized by human umbilical vein endothelial cells are closely linked when detected on co-cultured agarose beads. *APMIS* 105(1): 17-24

Birnbaum M. J., Clem R. J., Miller L. K. (1994) An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motifs. *J Virol* 68(4): 2521-2528

Bodmer J-L., Burns K., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Thome M., Bornand T., Hahne M., Schroter M., Becker K., Wilson A., French L. E., Browning J. L., MacDonald H. R., Tschopp J. (1997) TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor 1 and Fas(Apo1/CD95). *Immunity* 6(1): 79-88

Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. (1997) Cellular Responses to Interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 15: 749-795

Boldin M. P., Goncharov T. M., Goltsev Y. V., Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/Apo-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85(6): 803-815

Brouckaert P. G., Leroux-Roels G. G., Guisez Y., Tavernier J., Fiers W. (1986) *In vivo* anti-tumor activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. *Int J Cancer* 38(5): 763-769

Buttayan R., Olsson C. A., Pintar J., Chang C., Bandyk M., NG P-Y., Sawczuk I. S. (1989) Induction of the TRPM-2 Gene in Cells undergoing Programmed Death. *Mol Cell Biol* 9(8): 3473-3481

Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(9): 3666-3670

Chao D. T., Korsmeyer S. J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16: 395-419

Chaudhary P. M., Eby M., Jasmin A., Bookwalter A., Murray J., Hood L. (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7(6): 821-30

Chicheportiche Y., Bourdon P. R., Xu H., Hsu Y. M., Scott H., Hession C., Garcia I., Browning J. L. (1997) TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272(51): 32401-32410

Chinnaiyan A. M., Tepper C. G., Seldin M. F., O'Rourke K., Kischkel F. C., Hellbardt S., Krammer P. H., Peter M. E., Dixit V. M. (1996a) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271(9): 4951-4965

Chinnaiyan A. M., O'Rourke K., Yu G. L., Lyons R. H., Garg M., Duan D. R., Xing L., Geutz R., Ni J., Dixit V. M. (1996b) Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274(5289): 990-992

Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16

- Cohen P. L., Eisenberg R. A. (1991) Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 9: 243-269
- Cory S. (1995) Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 13: 513-43
- Cotterill S. J., Ahrens S., Paulussen M., Jürgens H. F., Voûte P. A., Gadner H., Craft A. W. (2000) Prognostic Factors in Ewing's Sarcoma Tumor of Bone: Analysis of 975 Patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncology* 18(17): 3108-3114
- Crook N. E., Clem R. J., Miller L. K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zincfinger-like motif. *J Virol* 67(4): 2168-2174
- Cryns V., Yuan J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev* 12(11): 1551-1570
- Degli-Esposti M. A., Smolak P. J., Walczak H., Wangh J. Y., Huang C. P., DuBose R. F., Goodwin R. G., Smith C.A. (1997a) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186(7): 1165-1170
- Degli-Esposti M. A., Dougall W. C., Smolak P. J., Wangh J. Y., Smith C. A., Goodwin R. G. (1997b) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7(6): 813-820
- Delattre O., Zucman J., Plougastel B., Desmaze C., Melot Th., Peter M., Kovar H., Joubert I., deJong P., Rouleau G., Aurias A., Thomas G. (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359: 162-165
- Detjen K. M., Farwig K., Welzel M., Wiedenmann B., Rosewicz S. (2001) Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut* 49(2): 251-262
- Deveraux Q. L., Reed J. C. (1999) IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13(3):239-252

- Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S., Reed J. C. (1997) x-linked IAP is a direct inhibitor of cell proteases. *Nature* 388(6639): 300-304
- DiDonato J. A., Hayakawa M., Rothwarf D. M., Zandi E., Karin M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388(6642): 548-554
- Druilhe A., Arock M., Le Goff L., Pretolani M. (1998) Human Eosinophils express Bcl-2 Family Proteins: Modulation of Mcl-1 Expression by IFN- γ . *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 315-322
- Du Y. S., Bales K. R., Dodel R. C., Hamilton-Byrd E., Horn J. W., Czilli D. L., Simmons L. K., Ni B., Paul S. M. (1997) Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21): 11657-11662
- Eggert A., Grotzer M. A., Zuzak T. J., Wiewrodt B. R., Ho R., Ikegaki N., Brodeur G. M. (2001) Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 61(4): 1314-1319
- Emery J. G., McDonnell P., Burke M. B., Deen K. C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E. R., Eichmann C., Di Prinzio R., Dodds R. A., James I.E., Rosenberg M., Lee J. C., Yong P. R. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273: 14363-14367
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662): 43-50
- Ewing J. (1921) Diffuse Endothelioma of Bone. *Proceedings of the New York Pathological Society* 21:17
- Fisher G. H., Rosenberg F. J., Straus S. E., Dale J. K., Middleton L. A., Lin A. Y., Strober W., Leonardo M. J., Puck J. M. (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 589-592

- Fransen L., Van der Heyden J., Ruyschaert R., Fiers W. (1986) Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22(4): 419-426
- French L. E., Tschopp J. (1999) The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 5(2): 146-147
- Fulda S., Küfer M. U., Meyer E., van Valen F., Dockhorn-Dworniczak B., Debatin K-M. (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of Caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20: 5865-5877
- Gasque P., Fontaine M., Morgan B. P. (1995) Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol* 154(9): 4726-4733
- Gearing A. J., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A. H., Drummond A. H., Galloway W. A., Gilbert R., Gordon J. L. et al. (1994) Processing of tumor necrosis factor-alpha precursors by metalloproteinases. *Nature* 370(6490): 555-557
- Green D. R., Reed J. C. (1998) Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
- Griffith T. S., Chin W. A., Jackson G. C., Lynch D. H., Kubin M. Z. (1998) Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 161(6): 2833-2840
- Griffith T. S., Lynch D. H. (1998) TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 10: 559-563
- Grossmann D., McNiff J. M., Li F., Altieri D. C. (1999) Expression and Targeting of the Apoptosis Inhibitor, Survivin, in Human Melanoma. *J Invest Dermatol* 113: 1076-1081
- Grotzer M. A., Eggert A., Zuzak T. J., Janss A. J., Marwaha S., Wiewrodt B. R., Ikegaki N., Brodner G. M., Phillips P. C. (2000) Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19(40): 4604-4610

- Gruss H. J., Dower S. K. (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85(12): 3378-3404
- Gupta S., Xia D., Jiang M., Lee S., Pernis A. B. (1998) Signaling Pathways Mediated by the TNF- and Cytokine-Receptor Families target a common cis-Element of the IFN Regulatory Factor 1 Promotor. *J Immunol* 161: 5997-6004
- Hannun Y. A. (1997) Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood* 89(6): 1845-1853
- Havell E. A., Fiers W., North R. J. (1988) The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med* 167(3): 1067-1085
- Hopkins-Donaldson S., Bodmer J-L., Bourlond K. B., Brognara C. B., Tschopp J., Gross N. (2000) Loss of Caspase-8 Expression in Highly Malignant Human Neuroblastoma Cells Correlates with Resistance to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis. *Cancer Res* 60: 4315-4319
- Horowitz M. E., Malawer M. M., Woo S. Y., Hicks M. J. (1997) Ewing's Sarcoma Family of Tumors: Ewing's Sarcoma of Bone and Soft Tissue and the Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors. In: Pizzo P. A., Poplack D. G. (eds.) *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 831-863
- Hsu H., Shu H. B., Pan M. G., Goeddel D. V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84(2): 299-308
- Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J-L., Schröter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L. E., Tschopp J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195
- Jo M., Kim T-H., Seol D-W., Esplen J. E., Dorko K., Billiar T. R., Strom S. C. (2000) Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6(5): 564-567

Kamada S., Washida M., Hasegawa J-i., Kusano H., Funahashi Y., Tsujimoto Y. (1997) Involvement of Caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway. *Oncogene* 15: 285-290

Kashii Y., Giorda R., Herberman R. B., Whiteside Th., Vujanovic N. L. (1999) Constitutive Expression and Role of the TNF Family Ligands in Apoptotic Killing of Tumor Cells by Human NK Cells. *J Immunol* 163: 5358-5366

Keane M. M., Ettenberg S. A., Lowrey G. A., Russell E. K., Lipkowitz S. (1996) Fas Expression and Function in Normal and Malignant Breast Cell Lines. *Cancer Res* 56: 4791-4798

Keane M. M., Ettenberg S. A., Nau M. M., Russell E. K., Lipkowitz S. (1999) Chemotherapy Augments TRAIL-induced Apoptosis in Breast Cell Lines. *Cancer Res* 59: 734-741

Kerr J. F. R., Winterford C. M., Harmon B. V. (1994) Apoptosis – Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer* 73: 2013-2026

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: 239-257

Kischkel F. C., Lawrence D. A., Chuntharapai A., Schow P., Kim K. J., Ashkenazi A. (2000) Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620

Kitson J., Raven T., Jiang Y. P., Goeddel D. V., Giles K. M., Pnu K. T., Grinham C. J., Brown R., Farrow S. N. (1996) A death-domain-containing receptor mediates apoptosis. *Nature* 384(6607): 372-375

Kontny H. U., Lehrnbecher T. M., Chanock S. J., Mackall C. L. (1998) Simultaneous Expression of Fas and Nonfunctional Fas Ligand in Ewing's Sarcoma. *Cancer Res* 58: 5842-5849

Kovar H. (1998) Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. *Curr Opin Oncol* 10: 334-342

- Kuang A. A., Diehl G. E., Zhang J., Winoto A. (2000) FADD Is Required for DR4- and DR5-mediated Apoptosis. *J Biol Chem* 275(33): 25065-25068
- Kumar A., Jasmin A., Eby M. T., Chaudhary P. M. (2001) Cytotoxicity of Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand towards Ewing's sarcoma cell lines. *Oncogene* 20(8): 1010-1014
- Kumar-Sinha C., Varambally S., Sreekumar A., Chinnaiyan A. M. (2001) Molecular Cross-Talk Between the TRAIL and Interferon Signaling Pathways. *J Biol Chem* in press
- LaCasse E. C., Baird S., Komeluk R. G., MacKenzie A. E. (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in Cancer. *Oncogene* 17(25): 3247-3259
- Lawrence D., Shahrokh Z., Marsters S., Achilles K., Shih D., Mounho B., Hillan K., Totpal K., DeForge L., Schow P., Hooley J., Sherwood S., Pai R., Leung S., Khan L., Gliniak B., Bussiere J., Smith C. A., Strom S., Kelley S., Fox J. A., Thomas D., Ashkenazi A. (2001) Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7(4): 383-385
- Li F., Ambrosini G., Chu E. Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P. C., Altieri D. C. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396(6711): 580-584
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-489
- Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-184
- Malinin N. L., Boldin M. P., Kovalenko A. V., Wallach D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385(6616): 540-544
- Marsters S. A., Sheridan J. P., Donahue C. J., Pitti R. M., Gray C. L., Goddard A. D., Bauer K. D., Ashkenazi A. (1996) Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol* 6(12): 1669-1676

Marsters S. A., Sheridan J. P., Pitti R. M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Guney A., Goddard A. D., Godowsky P., Ashkenazi A. (1997) A novel receptor for Apo2/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7: 1003-1006

Marsters S. A., Sheridan J. P., Pitti R. M., Brush J., Goddard A., Ashkenazi A. (1998) Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8(9): 525-528

Miller, L. K. (1999) An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 9: 323-328

Mitsiades N., Poulaki V., Mitsiades C., Tsokos M. (2001) Ewing's Sarcoma Family Tumors Are Sensitive to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand and Express Death Receptor 4 and Death Receptor 5. *Cancer Res* 61: 2704-2712

Miwa K., Asano M., Horai R., Iwakura Y., Nagata S., Suda T. (1998) Caspase-1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* 4: 1287-1292

Mühlenbeck F., Schneider P., Bodmer J-L., Schwenzer R, Hauser A., Schubert G., Scheurich P., Moosmayer D., Tschopp J., Wajant H. (2000) The Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 Have Distinct Cross-linking Requirements for Initiation of Apoptosis and Are Non-redundant in JNK Activation. *J Biol Chem* 275(41): 32208-32213

Nagata S. (1997) Apoptosis by Death Factor. *Cell* 88: 355-365

Nagata S., Golstein P. (1995) The Fas Death Factor. *Science* 267: 1449-1456

Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C., Grignani F., Riccardi C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279

Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T., Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 264: 806-809

Old L. J. (1985) Tumor Necrosis Factor (TNF). *Science* 230: 630-632

- Oltvai Z. N., Milliman C. L., Korsmeyer S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4): 609-619
- Orth K., Chinnaiyan A. M., Garg M., Froelich C. J., Dixit V. M. (1996) The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 271(28): 16443-16446
- Oshima K., Yanase N., Ibukiyama C., Yamashina A., Kayagaki N., Yagita H., Mizuguchi J. (2001) Involvement of TRAIL/TRAIL-R interaction in IFN-alpha-induced apoptosis of Daudi B lymphoma cells. *Cytokine* 14(4): 193-201
- Ossina N. K., Cannas A., Powers V. C., Fitzpatrick P. A., Knight J. D., Gilbert J. R., Shekhtman E. M., Tomei L. D., Umansky S. R., Kiefer M. C. (1997) Interferon- γ Modulates a p53-independent Apoptotic Pathway and Apoptosis-related Gene Expression. *J Biol Chem* 272(26): 16351-16357
- Pammer J., Weninger W., Ban J., Wojta J., Tschachler E. (1999) The cell death regulatory protein bak is expressed in endothelial cells in inflamed tissues and is induced by IFN-gamma *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 264(1): 139-143
- Pan G., Ni J., Wei Y-F., Yu G-l., Gentz R., Dixit V. M. (1997) An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL. *Science* 277: 815-818
- Pan G., Bauer J. H., Haridas V., Wang S., Liu D., Yu G., Vincenz C., Aggarwal B. B., Ni J., Dixit V. M. (1998) Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431(3): 351-356
- Paulussen M., Jürgens H. (2000) Ewing-Sarkom und PNET des Kindesalters. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Deutsche Krebsgesellschaft e. V. (Hrsg.)
- Pitti R. M., Marsters S. A., Ruppert S., Donahue C. J., Moore A., Ashkenazi A. (1996) Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *The J Biol Chem* 271(22): 12687-12690

Platanias L. C., Fish E. N. (1999) Signaling pathways activated by interferons. *Experimental Hematology* 27: 1583-1592

Rathburn R. K., Christianson T. A., Faulkner G. R., Jones G., Keeble W., O'Dwyer M., Bagby G. C. (2000) Interferon- γ -induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve Caspase-8-dependent activation of Caspase 3 family members. *Blood* 96(13): 4204-4211

Rheaume E., Cohen L. Y., Uhlmann F., Lazure C., Alam A., Hurwitz J., Sekaly R. P., Denis F. (1997) The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 *in vitro* and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J* 16(21): 6346-6354

Ribeiro P., Renard N., Warzocha K., Charlot C., Jeandenant L., Callet-Bauchu E., Coiffier B., Salles G. (1998) CD40 regulation of death domains containing receptors and their ligands on lymphoma B cells. *Br J Haematol.* 103(3): 684-689

Rieger J., Naumann U., Glaser T., Ashkenazi A., Weller M. (1998) APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma?. *FEBS Lett* 427: 124-128

Rieux-Lancat F., LeDeist F., Hivroz C., Roberts I. A., Debatin K. M., Fischer A., deVillarty J. P. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268: 1347-1349

Roy N., Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S., Reed J. C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16(23): 6914-6925

Sancéau J., Hiscott J., Delattre O., Wietzerbin J. (2000) IFN- β induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene* 19: 3372-3383

Sarela A. I., Macadam R. C. A., Farmery S. M., Markham A. F., Guillou P. J. (2000) Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 46: 645-650

- Schneider P., Thome M., Burns K., Bodmer J-L., Hofmann K., Kataoka T., Holler N., Tschopp J. (1997) TRAIL Receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF κ B. *Immunity* 7: 831-836
- Screaton G. R., Xu X. N., Olsen A. L., Cowper A. E., Tan R., McMichael A. J., Bell J. I. (1997a) LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(9): 4615-4619
- Screaton G. R., Mongkolsapaya J., Xu X. N., Cowper A. E., McMichael A. J., Bell J. I. (1997b) TRICK 2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 7(9): 693-696
- Sedger L. M., Shows D. M., Blanton R. A., Peschon J. J., Goodwin R. G., Cosman D., Wiley S. R. (1999) IFN- γ Mediates a Novel Antiviral Activity Through Dynamic Modulation of TRAIL and TRAIL Receptor Expression. *J Immunol* 163: 920-926
- Sen G. C., Ransohoff M. (1993) Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 42: 57-102
- Sheridan J. P., Marsters S. A., Pitti R. M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., Ramakrishnan L., Gray C. L., Baker K., Wood W. I., Goddard A. D., Godowski P., Ashkenazi A. (1997) Control of TRAIL-Induced Apoptosis by a Family of Signaling and Decoy Receptors. *Science* 277: 818-821
- Shin E. C., Ahn J. M., Kim C. H., Choi Y., Ahn Y. S., Kim H., Kim S. J., Park J. H. (2001a) IFN- γ induces cell death in human hepatoma cells through a TRAIL/death receptor-mediated apoptotic pathway. *Int J Cancer* 93(2): 262-268
- Shin S., Sung B-J., Cho Y-S., Kim H-J., Ha N-C., Hwang J-I., Chung C-W., Jung Y-K., Oh B-H. (2001b) An Anti-apoptotic Protein Human Survivin is a direct Inhibitor of Caspase-3 and -7. *Biochemistry* 40: 1117-1123
- Smith C. A., Farrah T., Goodwin R. G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76(6): 959-962

Sprick M. R., Weigand M. A., Rieser E., Rauch C. T., Juo P., Blenis J., Krammer P. H., Walczak H. (2000) FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity* 12: 599-609

Stephanou A., Brar B. K., Scarabelli T. M., Jonassen A. K., Yellon D. M., Marber M. S., Knight R. A., Latchman D. S. (2000) Ischemia-induced STAT-1 Expression and Activation Play a Critical Role in Cardiomyocyte Apoptosis. *J Biol Chem* 275(14): 10002-10008

Strasser A., Huang D. C., Vaux D. L. (1997) The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1333(2): F151-F178

Takahashi T., Tanaka M., Brannan C. I., Jenkins N. A., Copeland N. G., Suda T., Nagata S. (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969-976

Takahashi A., Alnemri E. S., Lazebnik Y. A., Fernandes-Alnemri T., Litwach G., Moir R. D., Goldman R. D., Poirier G. G., Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. (1996) Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(16): 8395-8400

Tamm I., Kornblau S. M., Segall H., Krajewski S., Welsh K., Kitada S., Scudiero D. A., Tudor G., Qui Y. H., Monks A., Andreeff M., Reed J. C. (2000) Expression and Prognostic Significance of IAP-Family Genes in Human Cancers and Myeloid Leukemias. *Clin Cancer Res* 6: 1796-1803

Tamm I., Wang Y., Sansville E., Scudiero D. A., Vigna N., Oltersdorf T., Reed J. C. (1998) IAP-family protein inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, Caspases and anticancer drugs. *Cancer Res* 58(23): 5315-5320

Tanaka M., Suda T., Haze K., Nakamura N., Sato K., Kimura F., Motoyoshi K., Mizuki M., Tajawa S., Ohga S., Hatake K., Drummond A. H., Nagata S. (1996) Fas ligand in human serum. *Nat Med* 2(3): 317-322

- Tartaglia L. A., Ayres T. M., Wong G. H., Goeddel D. V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74(5): 845-853
- Tartaglia L. A., Goeddel D. V. (1992) Two TNF receptors. *Immunol Today* 13(5): 151-153
- Teitz T., Wei T., Valentine M. B., Vanin E. F., Grenet J., Valentine V. A., Behm F. G., Look A. T., Lahti J. M., Kidd V. J. (2000) Caspase-8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6: 529-535
- Thornberry N. A., Lazebnik Y. (1998) Caspases: Enemies Within. *Science* 281: 1312-1316
- Trauth B. C., Klas C., Peters A. M. J., Matzku S., Möller P., Falk W., Debatin K-M., Krammer P. H. (1989) Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression by Induction of Apoptosis. *Science* 245: 301-305
- Tsujimoto M., Yip Y. U., Vilcek J. (1986) Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* 136(7): 2441-2444
- Van Valen F., Fulda S., Truckenbrod B., Eckervogt V., Sonnemann J., Hillmann A., Rodl R., Hoffmann C., Winkelmann W., Schafer L., Dockhorn-Dworniczak B., Wessel T., Boos J., Debatin K-M., Jürgens H. (2000) Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int J Cancer* 88(2): 252-259
- Van Valen F., Winkelmann W., Burdach S., Göbel U., Jürgens H. (1993) Interferon γ and tumor necrosis factor α induce a synergistic antiproliferative response in human Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 119: 615-621
- Walczak H., Degli-Esposti M. A., Johnson R. S., Smolak P. J., Waugh J. Y., Boiani N., Timour M. S., Gerhart M. J., Schooley K. A., Smith C. A., Goodwin R. G., Rauch C. T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16(17): 5386-5397
- Walczak H., Miller R. E., Ariail K., Gliniak B., Griffith T. S., Kubin M., Chin W., Jones J., Woodward A., Le T., Smith C., Smolak P., Goodwin R. G., Rauch C. T., Schuh J. C. L., Lynch D. H. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 5(2): 157-163

- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Nagata S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317
- Weller M., Frei K., Groscurth P., Krammer P. H., Yonehara Y., Fontana A. (1994) Anti-Fas/Apo-1 antibody mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J Clin Invest* 94: 954-964
- Whang Y. E., Wu X., Suzuki H., Reiter R. E., Tran C., Vessella R. L., Said J. W., Isaac W. B., Sawyers C. L. (1998) Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC 1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5246-5250
- Wheelock E F (1965) Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149: 310-311
- Wiley S. R., Schooley K., Smolak P. J., Din W. S., Huang C-P., Nicholl J. K., Sutherland G. R., Smith T. D., Rauch C., Smith C. A., Goodwin R. G. (1995) Identification and Characterization of a New Member the TNF Family that Induces Apoptosis. *Immunity* 3: 673-682
- Wilson M. R., Easterbrook-Smith S. B. (2000) Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *TIBS* 25: 95-98
- Wu G. S., Burns T. F., McDonald E. R. III, Jiang W., Meng R., Krantz I. D., Kao G., Gan D. D., Zhou J. Y., Muschel R., Hamilton S. R., Spinner N. B., Markowitz S., Wu G., el-Deiry W. S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet.* 17(2): 141-143
- Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Currie A. R. (1980) Cell Death: The Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-303
- Yang E., Korsmeyer S. J. (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88(2): 386-401

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. T., Jones D. P., Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrom c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303): 1129-1132

Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. (1989) A Cell-Killing monoclonal Antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of Tumor Necrosis Factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756

Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M., Hovitz H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 75(4): 641-652

Zhang X. D., Franco A., Myers K., Gray C., Nguyen T., Hersey P. (1999) Relation of TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE-inhibitory Protein Expression to TRAIL-induced Apoptosis of Melanoma. *Cancer Res* 59: 2747-2753

7 Danksagung

Danken möchte ich abschließend insbesondere Herrn PD Dr. med. Udo Kontny, der diese Arbeit initiiert hat, für das spannende Thema, die jederzeit verfügbare Betreuung während der Durchführung der Versuche, die Motivation in Krisenzeiten und nicht zuletzt für die Übernahme der Erstkorrektur dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. C. M. Niemeyer danke ich für ihre konstruktive Kritik vor allem in diversen Labormeetings, die mir geholfen hat die Distanz zu meinen eigenen Ergebnissen zu bewahren, sowie für ihre initiale Bereitschaft die Erstkorrektur dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. med. P. Fisch danke ich für die gute Zusammenarbeit zwischen der Kinderklinik und der Pathologie und in diesem Rahmen vor allem für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit und Einarbeitung in dieses komplexe Thema.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Kinderklinik, besonders natürlich den Mitarbeitern und Doktoranden des hämato-onkologischen Forschungslabors herzlich danken für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

.....

Name	Ruth Klein
Geburtsdatum	18. November 1976
Geburtsort	Bad Oeynhausen
Eltern	Eberhard Klein, Arzt Etha Klein, Hausfrau

Schulbildung

.....

1983 - 1987	Grundschule Eidinghausen, Bad Oeynhausen
1987 - 1993	Immanuel-Kant Gymnasium, Bad Oeynhausen
1993 - 1994	Kankakee-Valley High School, Wheatfield, IN, USA
1994	High School Graduation
1994 - 1996	Immanuel-Kant Gymnasium, Bad Oeynhausen
1996	Abitur

Studium

.....

Oktober 1996	Beginn des Medizinstudiums, Medizinische Universität zu Lübeck
Oktober 1998	Physikum
Oktober 1998	Fortsetzung des Medizinstudiums, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau
September 1999	Erstes Staatsexamen
Oktober 2002	Zweites Staatsexamen
November 2003	Drittes Staatsexamen

Famulaturen

.....

Februar 1999 – März 1999	Innere Abteilung, St. Josefskrankenhaus, Freiburg im Breisgau
September 1999 – Oktober 1999	Chirurgische Abteilung, Landeskrankenanstalten Salzburg, Österreich
März 2001	Division of Oncology, Children's Hospital of Philadelphia, PA, USA
April 2001	Division of General and Thoracic Surgery, Children's Hospital of Philadelphia, PA, USA
Juli 2001 – August 2001	Allgemeine Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital, München

September 2001

Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie im
Kindes- und Jugendalter, Universitätsklinikum,
Freiburg im Breisgau

Praktisches Jahr

.....

Oktober 2002 – Januar 2003

Chirurgie, Kantonales Spital Sursee-Wolhusen,
Sursee, Schweiz

Februar 2003 – Mai 2003

Pädiatrie, Zentrum für Kinder- u. Jugendmedizin,
Universitätsklinikum Freiburg

Mai 2003 - August 2003

Innere Medizin, Medizinische Klinik,
Universitätsklinikum Freiburg