

Aus der
Klinik für Plastische Chirurgie und Schwerbrandverletzte
des Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikums Bergmannsheil
Bochum
der Ruhr-Universität Bochum
Direktor: Prof. Dr. med. H.U. Steinau

**Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung durch Taurolidin und
TRAIL in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Christina Brenzel
aus Bielefeld
2010

Dekan: Prof. Dr. med. K. Überla
Referent: PD Dr. med. A. Daigeler
Korreferent: Frau Prof. Dr. rer. nat. B. E. M. Brand-Saberi Kakhki
Tag der Mündlichen Prüfung: 08.11.2011

Abstract

Brenzel

Christina

Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung bei humanen Fibrosarkomzellen

Problem: Weichgewebssarkome stellen nach wie vor ein therapeutisches Dilemma dar, weil effektive Behandlungsstrategien – über die radikale Resektion hinaus – fehlen. Viele Therapiemaßnahmen erreichen zwar eine marginale Verbesserung des Outcome, insgesamt ist die Prognose – vor allem fortgeschrittener Stadien – aber weiterhin schlecht.

Fragestellung: Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von TRAIL und Taurolidin (TRD) – zwei Substanzen mit apoptoseinduzierenden Eigenschaften auf Tumorzellen, jedoch ohne toxische Nebenwirkungen auf Normalgewebe – auf humane Fibrosarkomzellen (HT1080) hinsichtlich Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung zu untersuchen.

Material und Methoden: Humane Fibrosarkomzellen wurden in Kultur mit den Wirksubstanzen inkubiert und ihre Vitalität sowie Apoptose und Nekrose im TUNEL-Assay dargestellt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Darüber hinaus führten wir Proliferationsassays durch. Veränderungen auf Ebene der Genexpression analysierten wir mittels RNA-Microarray und werteten die Ergebnisse im Hinblick auf einzelne Gene in der Real-time-PCR aus. Veränderungen auf Proteinebene untersuchten wir im Western Blot. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB wurde mittels ELISA dargestellt.

Ergebnis: TRAIL und TRD als Einzelsubstanzen induzierten apoptotischen Zelltod und reduzierten die Proliferation von HT1080-Zellen signifikant. Die Genexpression verschiedener Gene mit Bezug zum apoptotischen Signalweg (TRAIL: ARHGDI1, NFKB1A, TNFAIP3; TRD: HSPA1A/B, NFKB1A, GADD45A, SGK, JUN, MAP3K14) zeigte sich verändert. Die Kombination von TRD und TRAIL führte verglichen mit den Einzelsubstanzen vermehrt zum apoptotischen Zelltod und rief Veränderungen in der Expression einer Reihe von Genen hervor (u.a. HSPA1A/B, NFKB1A, PPP1R15A, GADD45A, AXL, SGK, DUSP1, JUN, IRF1, MYC, BAG5, BIRC3). Das NFκB-Assay zeigte eine entgegengesetzte Regulation diverser Untereinheiten des NFκB durch TRD, TRAIL und TRD+TRAIL.

Diskussion: Die Ergebnisse zeigen, dass TRD und TRAIL in humanen Fibrosarkomzellen effektiv Apoptose induzieren und die Proliferation hemmen. Eine Reihe von Genen scheint dabei involviert zu sein und es gibt Hinweise auf den NFκB-Signalweg als Schlüsselregulator der TRD/TRAIL-vermittelten Apoptose.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Hintergrund.....	13
1.1 Einleitung.....	13
1.2 Hintergrund.....	14
1.2.1 Das Fibrosarkom	14
1.2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik	14
1.2.1.2 Therapie	15
1.2.1.3 Prognose	17
1.2.2 Zelltod	17
1.2.2.1 Apoptose	17
1.2.2.2 Nekrose	20
1.2.2.3 Der NFκB-Signaltransduktionsweg.....	20
1.2.3 TRAIL/Apo2	21
1.2.4 Taurolidin.....	23
2 Fragestellung	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Zelllinie und Zellkulturmedium	26
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.3 Geräte.....	27
3.1.4 Chemikalien.....	28
3.1.5 Puffer und Lösungen	29
3.1.6 Wirksubstanzen	31
3.1.7 Antikörper und Färbereagenzien	31
3.1.8 Kits.....	31
3.1.9 Software	32
3.2 Methoden	32
3.2.1 Zellkultur	32
3.2.1.1 Auftauen.....	32
3.2.1.2 Mediumwechsel.....	33
3.2.1.3 Splitten	33
3.2.1.4 Kryokonservierung	33
3.2.1.5 Zellzahlbestimmung	34
3.2.2 Testsubstanzen und Dosisfindung.....	34
3.2.2.1 Testsubstanzen	34
3.2.2.2 Inkubation mit Testsubstanzen.....	34
3.2.2.3 Versuche zur Dosisfindung	34
3.2.2.4 Finale Versuche zur Apoptoseinduktion	35
3.2.3 Durchflusszytometrie	35
3.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	35
3.2.3.2 Zellaufbereitung und Messverfahren	37

3.2.3.3. Statistische Auswertung	38
3.2.4 Optische Verfahren.....	38
3.2.4.1 Lichtmikroskopie.....	38
3.2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	38
3.2.5 TUNEL Assay	38
3.2.5.1 Prinzip des TUNEL Assays	39
3.2.5.2 Zellaufbereitung.....	39
3.2.5.3 Durchführung	39
3.2.6 Proliferationsassay (BrdU).....	40
3.2.6.1 Prinzip des BrdU-ELISA.....	40
3.2.6.2 Zellaufbereitung und Durchführung	40
3.2.7 Untersuchungen auf mRNA Ebene.....	41
3.2.7.1 RNA-Isolierung	41
3.2.7.1.1 Prinzip.....	41
3.2.7.1.2 Zellaufbereitung und Durchführung	41
3.2.7.2 Oligonukleotid Microarray.....	42
3.2.7.2.1 Prinzip.....	42
3.2.7.2.2 RNA-Qualität.....	43
3.2.7.2.3 Durchführung.....	44
3.2.7.2.4 Auswertung.....	44
3.2.7.3 Datenvalidierung in der Real-time-PCR	45
3.2.8 Untersuchungen auf Protein-Ebene.....	46
3.2.8.1 Prinzip	46
3.2.8.2 Zellaufbereitung und Proteinisolierung.....	46
3.2.8.3 Proteingehaltbestimmung (BCA Protein Assay).....	47
3.2.8.3.1 Prinzip.....	47
3.2.8.3.2 Durchführung.....	47
3.2.8.4 Gelelektrophorese	47
3.2.8.4.1 Prinzip.....	47
3.2.8.4.2 Durchführung.....	48
3.2.8.5 Western Blot.....	49
3.2.8.6 Standard Immuno Detection.....	49
3.2.9 Transkriptionsfaktor-Aktivität (NFkB-activity-ELISA)	50
3.2.9.1 Prinzip	50
3.2.9.2 Kernextraktion	50
3.2.9.3 ELISA	51
4 Ergebnisse.....	52
4.1 Detektion und Quantifizierung apoptotischer Vorgänge	52
4.1.1 Durchflusszytometrie	52
4.1.1.1 Apoptoseinduktion durch TRAIL als Einzelsubstanz	52
4.1.1.1.1 Vitale Zellen	53

4.1.1.1.2 Apoptose.....	54
4.1.1.1.3 Nekrose	55
4.1.1.1.4 Dot-Plots	55
4.1.1.1.5 Fazit.....	56
4.1.1.2 Apoptoseinduktion durch TRD als Einzelsubstanz.....	56
4.1.1.2.1 Vitale Zellen	57
4.1.1.2.2 Apoptose.....	58
4.1.1.2.3 Nekrose	59
4.1.1.2.4 Dot-Plots	59
4.1.1.2.5 Fazit.....	60
4.1.1.3 Orientierender Versuch zur Substanz-Kombination	60
4.1.1.4 Effekte der Kombination von TRD und TRAIL	60
4.1.1.4.1 Vitale Zellen	61
4.1.1.4.2 Apoptose.....	62
4.1.1.4.3 Nekrose	63
4.1.1.4.4 Dot-Plots	63
4.1.2 TUNEL-Assay	64
4.2 Beurteilung der Zellmorphologie.....	65
4.2.1 Lichtmikroskopie	65
4.2.1.1 Zellwachstum	65
4.2.1.2 Einfluss von TRD und TRAIL auf die Zellmorphologie	65
4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie	67
4.3 Einfluss von TRD und TRAIL auf die Proliferation	68
4.3.1 Zellproliferations-BrdU-ELISA.....	68
4.3.1.1 Fazit	69
4.4 Effekte durch TRD und TRAIL auf Ebene der Genexpression	69
4.4.1 Oligonukleotid-Microarray	70
4.4.1.1 Allgemein	70
4.4.1.2 Heat Map.....	70
4.4.1.3 Clustering	71
4.4.1.4 Auswahl differentiell regulierter Gene für Validierung.....	71
4.4.2 Real-time PCR.....	73
4.4.2.1 Ergebnisse für ausgewählte Gene	73
4.4.2.2 Fazit	74
4.5 Effekte durch TRD und TRAIL auf Ebene der Proteinexpression.....	75
4.5.1 Western Blot	75
4.5.1.1 Ergebnisse für ausgewählte Gene/Proteine	75
4.5.1.2 Fazit	78
4.6 Beeinflussung der NFκB-Signalkaskade durch TRD und TRAIL	78
4.6.1 Ergebnisse für ausgewählte Untereinheiten.....	79
4.6.2 Fazit	79

5 Diskussion	80
5.1 Studienaufbau	80
5.1.1 Auswahl der Zelllinie	80
5.1.2 Auswahl der Testsubstanzen.....	81
5.1.2.1 TRAIL	81
5.1.2.2 TRD.....	81
5.1.3 Fazit.....	82
5.2 Ergebnisse für Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung	82
5.2.1 Induktion von Apoptose und Nekrose	82
5.2.1.1 Auswahl der Methoden.....	82
5.2.1.2 Dosisfindung	83
5.2.1.3 Ergebnisse für TRAIL als Einzelsubstanz	83
5.2.1.4 Ergebnisse für TRD als Einzelsubstanz	84
5.2.1.5 Ergebnisse für die Kombination von TRD und TRAIL	85
5.2.1.6 Nekrose – eine kritische Evaluation	86
5.2.2 Morphologische Veränderungen/Adhäsionsverhalten	87
5.2.3 Proliferationshemmung.....	88
5.2.3.1 Methode	88
5.2.3.2 Ergebnis	88
5.2.4 Fazit.....	89
5.3 Mechanismen der Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung	89
5.3.1 Modulation der Genexpression und Translation	90
5.3.1.1 Methoden und Auswahl der untersuchten Gene	90
5.3.1.2 Ergebnisse zur Genexpression im Überblick.....	91
5.3.1.3 Ergebnisse zur Translation im Überblick	91
5.3.1.4 Ergebnisse im Detail	91
5.3.1.6 Fazit	98
5.3.2 Modulation der NFκB-Signalkaskade.....	99
5.3.2.1 NFκB-Signaltransduktion.....	99
5.3.2.2 NFκB-Untereinheiten.....	101
5.3.2.3 Fazit	102
5.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	103
6 Zusammenfassung	104
Literaturverzeichnis	106
Anhang	131

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance (univariate Varianzanalyse)
Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
ARHGDI A	s. <i>Rho-GDIα</i>
AXL	AXL receptor tyrosine kinase

B

BAG5	BCL2-associated athanogene 5
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl2l1	Bcl2-like 1
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BIRC2, BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2
BrdU	Bromdesoxyuridin

C

CAD	Caspase-activated DNase
Cas-2	Kaspase 2
Cas-3	Kaspase 3
Cas-8	Kaspase 8
Cas-9	Kaspase 9
Cas-10	Kaspase 10
CBB	Complete binding buffer
cDNA	Complementary DNA
c-FLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
c-IAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 2
cRNA	Complementary RNA

D

DFFA	DNA fragmentation factor subunit alpha
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DR	Death receptor
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
dUTP	Deoxyuridine triphosphate

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer

F

FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter

G

GADD34, -45A	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 bzw. 45 alpha
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatase Dehydrogenase
GDI	GDP-dissociation inhibitor
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat

H

HRP	Horseradish peroxidase
Hsp70	Heat shock protein 70kDa
HSPA1A, 1B	Hsp 70kDa 1A bzw.1B

I

IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of CAD
I κ B, I κ B α , I κ B δ	Inhibitor of NF κ B (alpha, delta)
IKK	Inhibitor of NF κ B kinase
IL1 β	Interleukin 1 beta
(ILP)	Isolated limb perfusion
INF	Interferon
IRF-1	Interferon regulytory factor 1

J

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
JNK	C-jun N-terminale Kinase
JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homologue

M

MA	Microarray
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAP2K4	MAP kinase kinase 4
MAP3K1	MAP kinase kinase kinase 1
MAP3K14	MAP kinase kinase kinase 14
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MEKK	MAP kinase kinase kinase
MEM	Modified Eagle's medium
MM	Miss match
MMP9	Matrix-Metallo-Proteinase 9
mRNA	Messenger RNA
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene

N

NaCl	Natrium-Chlorid (0,9%)
NEAA	Non-essential amino acids
NFκB	Nuclear factor kappaB
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light-polypeptide gene-enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NIK	NFκB-inducing kinase

O

OPG	Osteoprotegerin
-----	-----------------

P

PAA	Polyacrylamid
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline solution
PCR	Polymerase chain reaction
PKCK2	Protein Kinase CK2 (Casein Kinase 2)
PI	Propidium Iodid
PM	Perfect match
POD	Peroxidase
PPP1R15A	Protein phosphatase1 regulatory (inhibitor) subunit 15A
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R

RHD	Rel-homology domain
Rho-GDI(α)	Rho-GDP dissociation inhibitor (alpha)
RLT	RNA lysis tissue
RNA	Ribonucleic acid
rtPCR	Real-Time-PCR

S

SD	Standard deviation (Standard-Abweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase
SIRS	Systemic inflammatory syndrome
SLR	Signal log ratio
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low PI
SSC	Side scatter

T

Tab.	Tabelle
TAD	Transcription activation domain
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THD	TNF-homology domain
TNF, TNF α	Tumor necrosis factor (alpha)
TNFAIP3	TNF-alpha induced protein 3
TRADD	TNF-receptor type 1-associated death domain protein
TRAF1, -2, -3	TNF-receptor associated factor 1, -2 und -3
TRD	Taurolidin
TRAIL/Apo-2L	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R1, -R2	TRAIL-Rezeptor 1 bzw. -2
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

V

VEGF	Vascular endothelial growth factor
------	------------------------------------

W

WB	Western Blot
----	--------------

X

XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
------	---

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien	26
Tab. 2: Geräte	27
Tab. 3: Chemikalien	28
Tab. 4: TUNEL Assay, Lösungen zur Herstellung.....	30
Tab. 5: RNA-Isolierung, Puffer zur Durchführung	30
Tab. 6: Protein-Isolierung, Puffer zur Durchführung.....	30
Tab. 7: SDS-Gelelektrophorese, Puffer zur Durchführung.....	30
Tab. 8: Western-Blot, Puffer zur Durchführung	30
Tab. 9: Test- und Kontrollsubstanzen	31
Tab. 10: Antikörper und Färbereagenzien	31
Tab. 11: Kits.....	31
Tab. 12: Software.....	32
Tab. 13: Trypsinierung, benötigte Volumina	33
Tab. 14: finale Versuche, Konzentrationen und Passagen	35
Tab. 15: Durchflusszytometrie, mögliche Zellzustände nach Färbung.....	37
Tab. 16: SDS-PAGE, Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	48
Tab. 17: NFκB-ELISA, Kontrollen	51
Tab. 18: Microarray, Veränderung der Genexpression (SLR).....	72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: TRAIL, DISC-Formation.....	18
Abb. 2: Durchflusszytometrie, Dot-Plot	36
Abb. 3: Aufbau eines GeneChip-Array.....	43
Abb. 4: Western Blot, Beladung der Blottingkammer	49
Abb. 5: Reduktion vitaler Zellen durch TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml)	53
Abb. 6: Induktion von Apoptose durch TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml)	54
Abb. 7: Induktion von Nekrose durch TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml)	55
Abb. 8: Reduktion vitaler Zellen durch TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l)	57
Abb. 9: Induktion von Apoptose durch TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l)	58
Abb. 10: Induktion von Nekrose durch TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l)	59
Abb. 11: Reduktion vitaler Zellen durch TRD und TRAIL	61
Abb. 12: Induktion von Apoptose durch TRD und TRAIL	62
Abb. 13: Induktion von Nekrose durch TRD und TRAIL.....	63
Abb. 14: TUNEL-Assay, Proben	64
Abb. 15: TUNEL-Assay, Kontrollen.....	64
Abb. 16: Lichtmikroskopie	66
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopie	67
Abb. 18: BrdU-Proliferationsassay	69
Abb. 19: Microarray.....	71
Abb. 20: Western Blot, NFkBIA/IkB-α.....	75
Abb. 21: Western Blot, GADD45A	76
Abb. 22: Western Blot, GADD34/ PPP1R15A.....	76
Abb. 23: Western Blot, BIRC3/c-IAP-2.....	77
Abb. 24: Western Blot, MAP3K14/ NIK	77
Abb. 25: Western Blot, ARHGDI A / Rho GDI α.....	78
Abb. 26: NFkB-ELISA	79

Tabellenverzeichnis Anhang:

Tab. A1: Weichteilsarkome, Stadieneinteilung nach TNM 2002	131
Tab. A2: Weichteilsarkome, Stadieneinteilung nach UICC 2002	131
Tab. A3: NFκB, Zielgene und deren Eigenschaften	131
Tab. A4: TRAIL, Rezeptoren-System.....	132
Tab. A5: TRAIL, Eigenschaften und Funktionen	132
Tab. A6: Taurolidin, Eigenschaften und Funktionen	135
Tab. A7: Nährmedium, Zusammensetzung	137
Tab. A8: Dosisfindung, verwendete Konzentrationen	137
Tab. A9: Dosisfindung, verwendete Passagen	137
Tab. A10: TUNEL-Assay, Positiv- und Negativkontrolle	137
Tab. A11: BrdU-ELISA, Eichkontrollen	138
Tab. A12: RNA-Isolierung, Waschschrte zur Aufreinigung der RNA	138
Tab. A13: NFκB –ELISA, Wasch- und Inkubationsschritte	138
Tab. A14: Durchflusszytometrie, TRAIL.....	139
Tab. A15: Durchflusszytometrie, TRD.....	140
Tab. A16: Durchflusszytometrie, TRD + TRAIL (orientierend)	141
Tab. A17: Durchflusszytometrie, TRD + TRAIL (final).....	142
Tab. A18: BrdU-ELISA, Rohmesswerte	142
Tab. A19: MA, Experimentalgruppen gegen Kontrolle	143
Tab. A20: MA, Kombination gegen Einzelsubstanzen	145
Tab. A21: Validierung, Daten der PCR (SLR).....	147
Tab. A22: Validierung, Daten des Microarray (SLR).....	148
Tab. A23: NFκB-ELISA, Rohwerte.....	149
Tab. A24: Gene, Zusatzinformationen	150
Tab. A25: NFκB, Untereinheiten	155

Abbildungsverzeichnis Anhang:

Abb. A1: Sarkome 2009, n=63	157
Abb. A2: Sarkome 2008, n=143	157
Abb. A3: TNF-Superfamilie	158
Abb. A4: Dot-Plot Grafik, TRAIL	158
Abb. A5: Dot-Plot Grafik, TRD	159
Abb. A6: Dot-Plot Grafik, TRAIL + TRD	160
Abb. A7: Zellwachstum einer unbehandelten HT1080 Kultur	161
Abb. A8: Vitale HT1080 Zelle	162
Abb. A9: Fluoreszenzmikroskopie, Beispiele	163
Abb. A10: Microarray, Heat Map	164
Abb. A11: NF κ B-ELISA	165

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Einleitung

Fibrosarkome bilden eine kleine Einheit innerhalb der heterogenen Gruppe von Weichgewebssarkomen. Ihr Anteil beträgt ca. 2,6% aller Weichgewebssarkome, die wiederum mit einer Inzidenz von 2-4/100.000 [203] vorkommen. In der primären Behandlung ist bisher die chirurgische Resektion der entscheidende Faktor. Bestrahlung kann die lokale Tumorkontrolle zwar verbessern, im fortgeschrittenen Stadium sind die Therapieoptionen jedoch sehr begrenzt. Die Ansprechraten auf etablierte Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Ifosfamid (mit bestenfalls bis zu 30%) müssen bislang als ernüchternd beschrieben werden [53]. Die Suche nach neuen Behandlungsmethoden, welche das Spektrum therapeutischer Möglichkeiten erweitern, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Eine Möglichkeit, die Entstehung, Progression und Metastasierung von Malignomen zu unterbinden, ist die Apoptoseinduktion durch Zytostatika und Immunmodulatoren. Potentielle Kandidaten dafür sind Mitglieder der sogenannten TNF-Rezeptor-Superfamilie und ihre Liganden (TNF, Fas, TRAIL u.a.). TNF kommt bereits in der Behandlung von Weichgewebssarkomen zum Einsatz [56-57, 120], Studien belegten jedoch teilweise schwere systemische Nebenwirkungen durch unselektive apoptose-induzierende Effekte auf normale Zellen [83, 151, 206, 230]. Im Gegensatz dazu induziert TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) Apoptose in einer Reihe humaner Tumorzelllinien – in vitro und im Xenograft-Modell – erwies sich aber bei mindestens gleicher Wirksamkeit als deutlich weniger toxisch (vgl. Tabelle A5 im Anhang der Arbeit).

Neuere Studien wiesen apoptoseinduzierende Effekte für eine weitere Substanz nach: Taurolidin (TRD) – ein Derivat der Aminosäure Taurin mit antimikrobiellen und antiinflammatorischen Eigenschaften – wurde bislang zur Behandlung schwerer Infektionen in der Chirurgie eingesetzt [8, 127, 243]. Darüber hinaus zeigte es sich effektiv zur Apoptoseinduktion in einer

Reihe maligner Zellen in vitro und in vivo [21, 27, 128, 143, 152, 178, 235]. Erste Berichte erfolgreicher Behandlung von Glioblastomen und fortgeschrittenen Karzinomen des Magens beim Menschen ohne relevante systemische Nebenwirkungen erscheinen vielversprechend [23, 212]. Insbesondere die fehlende Toxizität im Gegensatz zu gängigen Zytostatika macht TRD zu einem Anwärter für die Malignomtherapie.

Die Kombination von TRD mit Liganden der TNF-Superfamilie, z.B. FasL, hat sich bereits als günstig erwiesen [210]. In aktuellen Studien an menschlichen Kolon- und Ösophaguskarzinomzellen konnten nun synergistische Effekte auch für die Kombination mit TRAIL gezeigt werden [34, 42]. Wir untersuchten hier die Wirkung der beiden Substanzen auf humane Fibrosarkome.

1.2 Hintergrund

1.2.1 Das Fibrosarkom

Beim Fibrosarkom handelt es sich um eine maligne Neoplasie des Bindegewebes, histologisch gekennzeichnet durch unreife proliferierende Fibroblasten. Derzeit wird eine Herkunft aus primitiven mesenchymalen Stammzellen angenommen. Charakteristisch sind das Wachstum entlang von Organstrukturen und die fast ausschließlich hämatogene Metastasierung. Eine lymphogene Metastasierung hingegen ist selten (<5%).

1.2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik

Die Inzidenz für Weichgewebssarkome beträgt 2-4/100.000 pro Jahr, ihr Anteil an allen Tumorerkrankungen ca. 1% [93], vgl. Abbildung A1 und A2 im Anhang. In Deutschland summieren sich die Neuerkrankungen auf 2.000-3.000 jährlich. Die WHO-Klassifikation für Weichgewebstumore umfasst 150 Entitäten – etwa 60 davon Sarkome – gemäß Beschreibung phänotypischer, weniger histogenetischer, Merkmale. Das Fibrosarkom ist mit einem Anteil von 2,6%-3,8% [112] der Weichgewebssarkome ein insgesamt seltener Tumor und dementsprechend wenig erforscht. Es tritt bevorzugt um das 45.-55. Lebensjahr auf und zu 40% in der unteren Extremität. Die Ätiologie ist

weitgehend unklar, Risikofaktoren stellen Exposition gegenüber Strahlung und bekannten Kanzerogenen (z.B. Asbest) dar, auch genetische Ursachen werden diskutiert. Häufig entstehen Fibrosarkome in Narben [239].

Die Diagnosestellung erfolgt oft erst spät, da kaum Frühsymptome auftreten [39]. Bei ca. 10% der Patienten liegen bereits bei Erstdiagnose Metastasen vor. Zur klinischen Diagnostik gehört vor allem das MRT. Die Stadieneinteilung erläutern die Tabellen A1 und A2.

1.2.1.2 Therapie

Die maßgebliche Verschiedenheit der Weichgewebssarkome untereinander und die Seltenheit der einzelnen Subtypen erschweren die Entwicklung spezifischer Therapiestrategien [12]. Entscheidendes Element der Behandlung ist die möglichst vollständige (R_0) Resektion des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsrand [74]. Amputation, wenngleich „ultima ratio“, kann bei Tumoren der Extremitäten unumgänglich für eine ausreichende radikale Entfernung sein. Bei allen multimodalen Therapiestrategien bleibt die Resektion im Gesunden wichtigster Faktor des Behandlungsplans [93].

Weichgewebssarkome gelten als relativ strahlenresistent, daher kann eine alleinige Radiatio nur als palliative Maßnahme empfohlen werden. Postoperative Radiatio ist bei Hochrisiko-Tumoren, das heißt lokal fortgeschrittenen und hochmalignen Prozessen sowie Rezidiven, indiziert [74]. Die Dosis muss ausreichend hoch sein (60-70Gy). Die Relevanz präoperativer Radiotherapie bleibt weiterhin unklar [93]: Trotz vergleichsweise verbesserter Überlebensraten in einer Studie zu Sarkomen der Extremitäten [150], ergab sich in anderen Studien kein signifikanter Vorteil [31].

Unter den Chemotherapeutika haben sich Adriamycin, Doxorubicin und Ifosfamid in der Behandlung von Weichgewebssarkomen als am wirksamsten erwiesen. Randomisierte Studien zum Nutzen neoadjuvanter Chemotherapie für Weichgewebssarkome sind rar. Eine EORTC-Studie zeigte im follow-up keinen signifikanten Überlebensvorteil [70]. Zusätzliche regionale Hyperthermie verbessert das Ansprechen von Hochrisiko-Sarkomen im Vergleich zur Chemotherapie allein [90], eine abschließende

Beurteilung ist jedoch noch nicht möglich. Neoadjuvante Radio-Chemotherapie erreichte bessere Resektionsraten, insbesondere bei höheren Dosen [165, 221]. Erweiterung dieser auf Polychemo-Protokolle verlängerte zusätzlich das Gesamtüberleben, erhebliche Wundkomplikationsraten [50] und hohe Toxizität erlauben den Einsatz jedoch weiterhin nur im Rahmen von Studien [190].

Die Relevanz adjuvanter Chemotherapie bleibt umstritten [93]. Für lokal begrenzte Weichgewebssarkome ergaben umfassende Meta-Analysen trotz verbesserter Tumorkontrolle widersprüchliche Daten zum Gesamtüberleben [147, 163, 220], derzeit wird daher empfohlen, den potentiellen Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie für jeden Patienten individuell abzuwägen [93]. Postoperative Tiefenhyperthermie kann in Kombination damit die lokale Kontrolle verbessern, nicht aber das Überleben [192, 240]. Eigentliches Hauptanwendungsgebiet der Chemotherapie sind inoperable und metastasierte Stadien. Bei Monotherapie mit Doxorubicin liegen die Ansprechraten bei 20-30%, das mediane Überleben bei 7,7-12 Monaten [187]. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ist darstellbar. Das weniger kardiotoxische Doxorubicin-Analogon Epirubicin erwies sich als nicht annähernd so wirksam [144]. Ifosfamid zeigt als einziges Zytostatikum ein vergleichbares Outcome, der direkte Vergleich mit Doxorubicin ergab keinen signifikanten Unterschied [121]. Kombinationstherapie erhöhte die Ansprechraten, nicht aber das Gesamtüberleben bei gleichzeitig verstärkter Toxizität, wie eine aktuelle Meta-Analyse zeigte, und wird daher nur im Einzelfall empfohlen – zugunsten einer palliativen OP oder zur Symptomlinderung [5, 226]. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren oder Stammzelltransplantation erlauben auch Hochdosis-Chemotherapie, der Nutzen ist jedoch umstritten [93, 101]. Die isolierte Extremitätenperfusion mit TNF- α und Melphalan erreicht hohe histologische Remissionsraten [225], stellt aber derzeit allein ebenfalls keine kurative Behandlungsmaßnahme dar [74].

Alternative und zielgerichtete Therapiestrategien befinden sich in unterschiedlichen Stadien der klinischen Erprobung [93]. Bei Fibrosarkomen scheinen vor allem EGF- und VEGF-Inhibition (Angiogenese-Hemmung) erfolgversprechend [176-177]. Aktuell konnte außerdem für die Kombination

von Arsen-Trioxid und ionisierender Strahlung ein apoptoseinduzierender Effekt auf HT1080 Fibrosarkomzellen gezeigt werden [33]. Photochemische und photodynamische Therapie mit Photosensitizern befinden sich noch in Prüfung [237]. Adjuvante photochemische Behandlung verbesserte aber das Outcome bei Versuchen mit HT1080 im Xenograft-Modell [146].

1.2.1.3 Prognose

Die Rezidivrate nach einfacher Resektion entlang der Tumorkapsel (marginale Resektion) beträgt 90%, aber auch nach adäquater Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand treten in 50% Rezidive auf. Bei medianem Überleben von 8-12 Monaten, sterben insgesamt 45% der Patienten innerhalb von fünf Jahren an ihrem Sarkom [52]. Pulmonale Metastasen sind am häufigsten, 80% der Metastasen entwickeln sich in den ersten zwei Jahren nach Diagnosestellung. Selbst bei Resezierbarkeit solitärer Metastasen liegt die 5-JÜR lediglich bei 20-30% [12, 52].

1.2.2 Zelltod

1.2.2.1 Apoptose

Apoptose ist die programmierte Form des Zelltodes, erstmals beschrieben von Kerr et. al. [105]. In einem streng regulierten, energieabhängigen Prozess wirkt die Zelle aktiv auf ihre eigene Zerstörung hin. Dies ist physiologisch und dient der kontrollierten, gezielten Elimination überflüssiger oder dysfunktionaler Zellen, z.B. während der Embryonalentwicklung oder im Immunsystem. In malignen Zellen ist dieser Vorgang häufig gestört.

Zentrales Element der kaskadenartig ablaufenden apoptotischen Signaltransduktion sind Cystein-Proteasen: Kaspasen (cysteiny-l-aspartate specific proteases), benannt nach ihrer Fähigkeit, spezifisch am C-terminalen Ende der Aminosäure Aspartat zu spalten [117]. Sogenannte Initiator-Kaspasen (-2, -8, -9 und -10) sind unter bestimmten Umständen zur proteolytischen Autoaktivierung fähig und prozessieren die nachgeschalteten Effektor-Kaspasen (u.a. -3,- 6 und -7). Zwei Wege führen in die Apoptose: der extrinsische und der intrinsische, mitochondriale Pathway [71]. Man unterscheidet drei Phasen:

Initiationsphase

Intrazelluläre Stimuli wie Onkogenaktivierung (z.B. p53), DNA-Schäden oder mangelnde Energieversorgung führen zu einer Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran mit Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum [71]. Der wichtigste ist Cytochrom-C, das sich im Zytosol mit Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) und Pro-Kaspase 9 (Cas-9), Initiator-Kaspase des intrinsischen Signalwegs, zum sog. Apoptosom verbindet [71]. So aktiviert, prozessiert Cas-9 ihrerseits die Effektor-Kaspasen-3 und -6.

Schlüsselfaktoren der extrazellulären Apoptoseinduktion sind die Rezeptoren der TNF-Superfamilie, genannt Todesrezeptoren (death receptors, DR), siehe Abbildung A3 im Anhang. Die den Liganden gemeinsame TNF homology domain (THD), eine C-terminale Aminosäuresequenz, vermittelt ihre Bindung an den Rezeptor. Kreuzvernetzung der Rezeptoren [18] durch Bindung der meist als Trimer vorliegenden Liganden initiiert die Formation eines DISC (death inducing signaling complex) unter Beteiligung von Adaptermolekülen, darunter FADD (Fas associated death domain), und Pro-Kaspase-8 (Cas-8), Initiator-Kaspase des extrinsischen Pathway [234, 242].

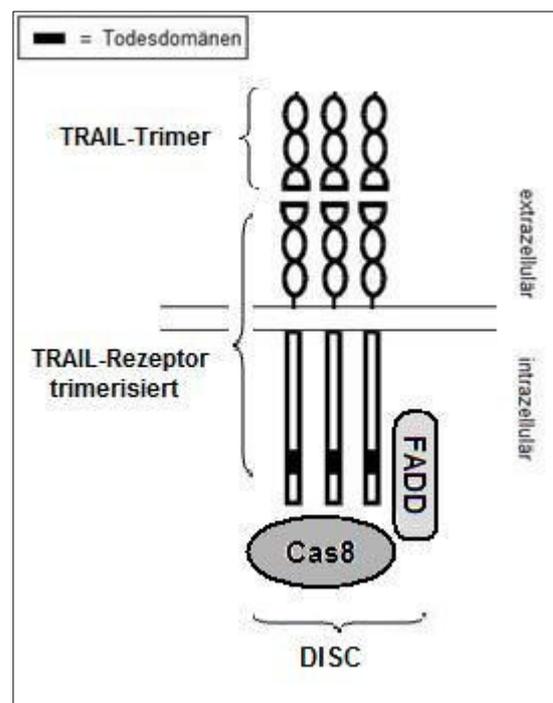


Abb. 1: TRAIL, DISC-Formation

Abbildung 1 veranschaulicht dies am Beispiel von TRAIL. Strukturalteration von Cas-8 im DISC begünstigt die Autokatalyse der Kaspase [137], so aktiviert kann sie nun nachfolgende Effektor-Kaspasen prozessieren. Gemeinhin wird angenommen, dass die physiologische Rolle FADD-bindender DR die Apoptoseinduktion [161] ist.

Effektorphase

Zielproteine der Effektor-Kaspasen sind einerseits zelluläre Substrukturen, z.B. Elemente des Zytoskeletts, andererseits Enzyme, die entweder induziert oder inaktiviert werden: CAD (Caspase activated DNase) ist beispielsweise in der vitalen Zelle in einem Inhibitor-Komplex (ICAD/DFFA) gebunden, der durch die aktivierte Cas-3 gespalten wird – was CAD in ihre aktive Form überführt [139]. Das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-Adenosin-Diphosphat-Ribose-Polymerase) hingegen wird durch Kaspasen fragmentiert und inaktiviert.

Degradationsphase

Charakteristische morphologische Veränderungen begleiten die intrazellulären Abläufe der Apoptose [106, 244]: Zellkontakte zum umgebenden Gewebe werden gelöst, Zytoplasma und Kernchromatin kondensieren, die Zelle schrumpft. Endonukleasen fragmentieren die DNA. Trümmer von Kern und Organellen schnüren sich in Vesikeln („apoptotic bodies“) von der Zelle ab (Englisch ‚blebbing‘) und werden von Makrophagen aufgenommen. Die Zellmembran bleibt währenddessen intakt, verliert aber ihre Asymmetrie: Phospholipide, z.B. Phosphatidylserin (PS), translozieren von der Innen- auf die Außenseite der Membran – ein mögliches Signal zur Phagozytose [191]. Bis zur schlussendlichen Fragmentierung der Gesamtzellen wird das Austreten lysosomaler Enzyme und damit eine Schädigung des Nachbargewebes mit resultierender Inflammationsreaktion vermieden.

Modulation und Feedbackloops

Apoptose ist ein äußerst komplexer Prozess, der eine Vielzahl von Faktoren und Feedbackmechanismen involviert: Die Bcl-2-Familie beispielsweise ist eng mit dem mitochondrialen Pathway verknüpft und besteht aus pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteinen, welche sowohl untereinander als auch mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten können. Aktivierte Cas-8 prozessiert unter anderem Bid (BH3-interacting domain death agonist), welches die Freisetzung von Cytochrom-C aus dem Mitochondrium fördert und so die extrinsische und intrinsischen Signalkaskade miteinander verbindet [123].

1.2.2.2 Nekrose

Nekrose wird auch „akzidenteller“ Zelltod genannt und bezeichnet den Untergang von Gewebe als Reaktion auf eine schwere chemische oder physikalische Zellschädigung, z.B. durch Hypoxie, Komplement oder lytische Viren. Verlust der Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase führt zum Wasser- und Ioneneinstrom mit hydropischer Schwellung von Zelle und Zellorganellen und schließlich Ruptur der Zellmembran. Lysosomale Enzyme gelangen dabei in den Interzellularraum und verursachen lokal eine Schädigung des umliegenden Gewebes mit konsekutiver Inflammation. Bisher nimmt man an, dass es sich um eine pathologische, unkontrollierte Passivreaktion handelt. Neueste Studien heben jedoch mögliche Regulationsmechanismen hervor [170].

1.2.2.3 Der NFκB-Signaltransduktionsweg

Der Transkriptionsfaktor NFκB/Rel (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) und seine Untereinheiten spielen eine Schlüsselrolle in der induzierbaren Expression vieler Gene, die für Mediatoren der Zellproliferation und Immunantwort kodieren [148]. Es handelt sich um Protein-Dimere, die über ein gemeinsames Strukturelement, die Rel-Homologie-Domäne (RHD), verbunden sind. Insgesamt existieren 5 verschiedene Untereinheiten (NFκB1/p50, NFκB2/p52, RelA/p65, RelB und c-Rel), die als Homo- oder Heterodimer vorliegen können und je nach Kombination unterschiedliche Effekte bedingen [148]. Über Bindung an regulatorische Abschnitte der DNA, sogenannte κB-Motive, führt NFκB zur Transkription, seltener zu Repression von Genen [81]. Die κB-Motive weisen eine gewisse Variabilität [148] und demnach Affinität zu unterschiedlichen Dimeren auf. Ohne entsprechende Stimuli liegt NFκB an Inhibitoren (IκB) gebunden im Zytoplasma vor, z.B. IκBα/NFκBIA (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) [148, 202]. Wachstumsfaktoren, Zytokine – darunter auch TNF u.ä. – oder physikalische Noxen können auf unterschiedlichem Weg Signalkaskaden induzieren, die über Aktivierung des IκBα-Kinase-Komplexes (IKK) und Phosphorylierung der Inhibitorproteine in der Freisetzung von NFκB münden (z.B. [9, 99]). Auch TRAIL kann NFκB induzieren [46, 48, 183, 193].

Die Genregulation durch NFκB ist überaus komplex, nicht zuletzt aufgrund seiner geringen Spezifität. Über 200 Gene werden beeinflusst (eine Auswahl zeigt Tab. A3), darunter pro- und anti-apoptotische [10, 81]. NFκB wird eine Schlüsselrolle in der Apoptose-Inhibition zugeschrieben ([9, 202] u.a.), der Transkriptionsfaktor wird daher mit Tumorwachstum, Zytostatika-Resistenzen und Metastasenbildung in Verbindung gebracht [148, 175, 236].

Tumortheraeutische Ansätze durch Inhibition von NFκB sind Gegenstand aktueller Forschung (z.B. [160]). TRAIL aktiviert NFκB, teilweise jedoch verzögert und v.a. in höherer Dosis; möglicherweise also ein sekundärer, indirekter Effekt [117, 198]. Die Inhibition von NFκB – z.B. durch IκkB-Inaktivierung – erhöht aber die Sensibilität für TRAIL [98, 102], so dass NFκB in jedem Fall gewichtigen Einfluss auf die TRAIL-Sensitivität besitzt [117].

1.2.3 TRAIL/Apo2

TRAIL, ein Protein von 33-35kD, wird aufgrund seiner THD zur TNF-Superfamilie gezählt [166, 242] (vgl. Abb. A3). Es wird in einer Vielzahl von Geweben als Typ II Transmembranprotein exprimiert [166, 242]; eine lösliche Variante kann auf bestimmte Stimuli hin proteolytisch abgespalten werden [125] und besitzt vermutlich eine regulatorische Funktion durch Ligandenbindung kompetitiv zu den effektiven Rezeptoren [117]. Wie TNF bildet lösliches TRAIL stabile Homotrimere, die ein Zn-Atom komplexieren, welches essentiell für ihre biologische Aktivität ist [16]. Es bindet an ein komplexes System von Rezeptoren, fünf wurden bisher identifiziert: TRAIL-R1 und -R2 vermitteln ein pro-apoptotisches Signal durch intrazelluläre Todesdomänen, sog. death domains (DD), die drei übrigen erwirken eher Apoptose-Prävention durch kompetitive Ligandenbindung (vgl. Tab. A4). Unterschiede im Ablauf der Apoptoseinduktion durch TRAIL verglichen mit anderen Liganden der TNF-Superfamilie liegen u.a. in den beteiligten Adaptermoleküle [117]. Abb. 1 (s. 1.2.2) veranschaulicht die Bindung eines TRAIL-Trimers an seinen Rezeptor.

TRAIL wird in vielen Geweben exprimiert [166, 242] und ist an der physiologischen Immunantwort auf tumoröse [122] und virale Prozesse [228]

beteiligt. Es agiert überwiegend als Apoptose-Induktor – vornehmlich über den extrinsischen Pathway [242], spezifisch getriggert über die genannten Rezeptoren [108], aber auch Induktion des mitochondrialen Pathway [7, 18, 154] sowie genregulatorische Funktionen wurden beschrieben, darunter auch Aktivierung von NFκB (vgl. 1.2.2.3). Im Gegensatz zu vielen anderen Zytostatika geschieht die Apoptoseinduktion durch TRAIL p53-unabhängig [18].

Therapeutischen Nutzen besitzt TRAIL durch seine Potenz in Tumorzellen Apoptose zu induzieren, ohne Nebenwirkungen auf Normalgewebe zu zeigen (vgl. Tab. A5). Im Xenograft-Modell bewirkte TRAIL Apoptoseinduktion (z.B. [6, 130, 232]) und reduzierte das Tumorwachstum (z.B. [232]). Es verhinderte außerdem das Auftreten von Fibrosarkomen in Mäusen nach Gabe eines Kanzerogens [214]. Für viele Substanzen – darunter bewährte Chemotherapeutika wie Doxorubicin [17] oder Cisplatin [223], aber auch INF [116] und Vitamin E-Derivate [43, 238] – konnte gezeigt werden, dass sie TRAIL-resistente Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisieren (vgl. Tab. A5) und synergistisch wirken; zuletzt übrigens auch für TRD [34, 42]. Umgekehrt erhöht TRAIL die Zytostatika-Sensitivität wenig sensibler Tumorzellen [117]. Auch die Kombination mit Bestrahlung (z.B. [32]) und Proteasom-Inhibitoren [4, 126] begünstigte die TRAIL-vermittelte Apoptose, letztere möglicherweise durch Inhibition von NFκB. Wie bereits erläutert, scheint dieser Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose zu spielen (vgl. 1.2.2.3).

Die Resistenz einiger Zelllinien gegen TRAIL ist ein viel beforschtes Phänomen [117, 174, 200] u.a.). Erwähnt werden sollte auch die teilweise hohe Toxizität rekombinanter TRAIL-Varianten auf Hepatozyten [96, 115] und andere gesunde Zellen [7, 108, 171, 232]. Lösliche TRAIL-Homomere ohne zusätzliche exogene Sequenzen – wie das von uns verwendete – werden von Mäusen und Primaten hingegen gut toleriert [7, 115, 138], auch in vitro sind bislang keine Nebeneffekte auf normales Gewebe beschrieben worden [7, 108, 115, 171, 182, 232]. (Weitere Details zu den Eigenschaften von TRAIL zeigt Tab. A5.)

1.2.4 Taurolidin

TRD (bis-(1,1-dioxoperhydro-1,2,4,-thiadiazinyl-4)Methan) ist ein synthetisch hergestelltes Derivat der semi-essentiellen Aminosulfonsäure Taurin [68-69, 164]. Ubiquitär in Säugetiergeweben vorkommend, ist sie die häufigste freie Aminosäure und hat eine Schutzfunktion gegen Zellschäden durch Sauerstoffradikale [194]. Ihr Derivat TRD wurde erstmals in den 1970er Jahren hergestellt und weist antimikrobielle, antiadhäsive und anti-endotoxische Eigenschaften auf (z.B. [68]). Durch Hydrolyse entstehen die aktiven Metaboliten Taurultam und Methyltaurultam, deren reaktive Methylgruppen z.B. mit Bestandteilen der bakteriellen Zellwand interagieren und zu einer irreversiblen Kreuzvernetzung der extrazellulären Matrix und Aufreißen der Zellmembran führen (vgl. Tab A6). TRD wirkt so auf ein breites Spektrum von Bakterien und Fungi [69, 164, 207], der antiadhäsive Effekt kann aber auch an eukaryotischen Zellen beobachtet werden und wurde klinisch zur Prophylaxe postoperativer Adhäsionen genutzt (z.B.[11]). TRD inaktiviert Endo- und Exotoxine, ebenfalls durch Interaktion mit seinen Methylgruppen ([134, 164] u.a.). In vitro wurde eine Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Mediatoren (TNF α , IL1 β) aus Monozyten [11] und Mesangiumzellen [119] gezeigt. Aufgrund dieser Eigenschaften wird TRD in der Klinik seit Jahren zur Prophylaxe und Behandlung lokaler und systemischer Inflammation, z.B. Peritonitis oder SIRS eingesetzt (vgl. Tab A6). Auch hemmende Effekte auf die Proliferation maligner Zellen sind nachgewiesen, in vitro sowie an Zelllinien ex vivo, darunter auch Osteosarkome [21, 44, 128, 143, 152, 178, 201, 235]. Am Xenograft-Modell konnte in-vivo die Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums humaner Karzinomzellen sowie die Hemmung der Metastasenbildung nach subkutaner Applikation von TRD gezeigt werden ([27, 41, 128] u.a.). Erste Studien zur Tumorbehandlungen am Menschen erscheinen aussichtsreich [23, 211-212].

TRD ist als Tumorthapeutikum vor allem deshalb von besonderem Interesse, weil es kaum toxische Nebenwirkungen oder Effekte auf Normalgewebe zeigt [27, 127]. Lediglich milde vagotone Symptome sind im

Tiermodell beobachtet worden [22]. Rasche enzymatische Biotransformation in endogenes Taurin und CO₂ [209] ist eine mögliche Erklärung dafür. Darüber hinaus scheint TRD in Kombination eine Reduktion toxischer Nebeneffekte konventioneller Chemotherapien erreichen zu können. Eine Xenograft-Studie mit rekombinantem TNF und Taurolidin an Fibrosarkomzellen der Maus zeigte, dass TRD die Begleiteffekte von TNF zu reduzieren vermag, ohne dabei dessen antineoplastische Wirkung zu beeinträchtigen [134].

Die genaue Wirkweise von TRD wird derzeit noch erforscht, wahrscheinlich liegen mehrere Mechanismen zugrunde. Diskutiert worden sind, neben der direkten Hemmung des Zellwachstums und Suppression proliferationsfördernder Zytokine [27, 210], unterschiedliche Wege der induzierten Signaltransduktion, mit ([78, 143, 152] u.a.) und ohne [180] Abhängigkeit von Kaspasen, Fas-Ligand abhängige Mechanismen [180, 210] sowie Inhibition der Tumorigenese [92, 180, 210]. Das Potential zur Apoptoseinduktion bei fehlender Toxizität macht TRD zu einem geeigneten Kombinationspartner für TRAIL. (Weitere Details zu TRD und seinen Eigenschaften zeigt Tab A6.)

2 Fragestellung

In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die Substanzen Taurolidin und rekombinantes TRAIL/Apo-2L einen neuen Therapieansatz zur Behandlung des humanen Fibrosarkoms darstellen könnten.

Die Wirkung von TRAIL und TRD einzeln und in Kombination auf niedrig differenzierte Fibrosarkomzellen (HT1080) wurde hinsichtlich Apoptose-induktion mittels Durchflusszytometrie und TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) und hinsichtlich Proliferationshemmung mittels BrdU-Proliferationsassay untersucht. Nach Beurteilung und Quantifizierung dieser Effekte folgten Untersuchungen zur Identifikation der beteiligten Mechanismen und Signaltransduktionswege. Ein Genexpressionsprofil im GeneChip-Microarray sollte Veränderungen auf mRNA-Ebene aufdecken. Die Ergebnisse zu Expressionsveränderungen wurden mittels Real-time-PCR validiert. Im Western Blot wurde evaluiert, inwieweit sich die Veränderungen auch in der Translation apoptosebezogener Proteine fortsetzten. Abschließend wurde die Aktivität speziell des Transkriptionsfaktors NF κ B mittels ELISA untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinie und Zellkulturmedium

Für diese Arbeit wurden niedrig differenzierte humane Fibrosarkomzellen der Zelllinie HT1080, erworben von ATCC (Wesel, Zelllinie CCI 121, Deutschland), in modifiziertem Eagle's medium (MEM) und NEAA (non-essential amino acids) mit Zusätzen kultiviert (die genaue Zusammensetzung findet sich in Tab. A7). Die Zellen stammen aus dem acetabulumnahen Tumor eines 35jährigen Kaukasiers und wurden zuerst beschrieben von S. Rasheed et al. [173]. Ihre Verdopplungszeit beträgt 12 Stunden (lt. ATCC).

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BioMax Light Film	Eastmen Kodak Company, Rochester, USA
Cryocups 2 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cups 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cups 15 ml	Falcon, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Frankreich
Cups 50 ml	Falcon, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Frankreich
Cytospin Cytoclips	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Cytospin Objektträger	Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland
Cytospin Probenkammer	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Einmalpipetten 2 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Einmalpipetten 5 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Einmalpipetten 10 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Einmalpipetten 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Sterican®, Melsungen, Deutschland
Messröhrchen	Falcon, Polystyrene round bottom tubes, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Frankreich

Multiwell Microtiterplatten (96-well)	Greiner Bio-One Biosciences, Frickenhausen, Deutschland
Microarray GeneChip Platte	Affymetrix, HG-U133A 2.0 Plus, UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Objektträger	Menzelgläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen 5 ml, 2 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Transfer Membran (TransBlot PVDF)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflaschen 12,5 cm ²	Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich

3.1.3 Geräte

Tab. 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Bioanalyzer	Agilent, 2100 Bioanalyzer, Böblingen, Deutschland
Blottingkammer	Invitrogen GmbH, XCell II Blot Module, Karlsruhe, Deutschland
Blutzellanalysesystem	Sysmex Deutschland GmbH, SF 3000, Norderstedt, Deutschland
Brutschrank	Forma Scientific, Forma 3035, Dreieich, Deutschland
Durchflusszytometer	BD Biosciences, FACS Calibur Flow Cytometer, Heidelberg, Deutschland
Filmentwickler	Eastman Kodak Company, M35 X-Omat Processor, Rochester, USA
Freezing Container	Nalge, Nalgene 5100 Cryo 1,0°C Freezing Container, New York, USA
Gefrierschrank -80,0°C	Heraeus, Hera freeze, Hanau, Deutschland
Gefrierschrank -30,0°C	Sanyo Scientific, Biomedical Freezer, Bensenville, USA
Gefrierschrank -20,0°C	Sanyo Scientific, Medicoool, Bensenville, USA
Gel-Analysesystem	Biometra GmbH i.L., BioDoc Analyze, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Mini Protean II, München, Deutschland
Kühlschrank +4,0°C	Sanyo Scientific, Medicoool, Bensenville, USA
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Microarray Scanner	Affymetrix, GeneChip Scanner 3000, UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Microplate Reader	Tecan trading AG, SunriseTM, Männedorf, Schweiz
Mikroskope	Leica Microsystems, Leica DM4000B, Nussloch, Deutschland Zeiss, Axiovert 25, Göttingen, Deutschland Zeiss, ID 03, Göttingen, Deutschland
Mini-Hybridisierungsöfen	Biometra GmbH i.L., OV 3, Göttingen, Deutschland
Mischer	IKA Werke GmbH und Co. KG, Vortex VF2, Staufen, Deutschland
Netzgeräte	Bio-Rad Laboratories GmbH, Power Pac 300, München, Deutschland GE Healthcare Europe GmbH, EPS 601, München, Deutschland
Photometer	MWG AG Biotech, Lambda E, Ebersberg, Deutschland
Pipettierhelfer	BRAND GmbH, accu-jet® pro, Wertheim, Deutschland
Schüttler	Biometra GmbH i.L., WT 12, Göttingen, Deutschland
Sequence Detector (rtPCR)	Applied Biosystems, ABI Prism 7900HT, Foster City, CA, USA
Sterilbank	Heraeus, Hera safe, Hanau, Deutschland
Thermo Cycler	Biometra GmbH i.L., WT 12, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer 5436, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	GFL 1083, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Biofuge fresco, Hanau, Deutschland Heraeus Instruments, Biofuge Primo R, Hanau, Deutschland Heraeus Instruments, Microfuge, Hanau, Deutschland Thermo Electron Corporation, Cytospin 3, Waltham, USA

3.1.4 Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/ Bis solution 30% (37,5 :1)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Cell Culture Lysis Reagent 5x	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O bidest	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
KCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Laemmli-Puffer 2x	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
Methanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
MEM	Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
Na ₂ HPO ₄	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumactetat	Apotheke, St. Josef-Hospital, Bochum, Deutschland
NaCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaOH (solid)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Na-Pyruvat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.5 Puffer und Lösungen

Die detaillierte Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen finden sich in Tab. 4-8:

Tab. 4: TUNEL Assay, Lösungen zur Herstellung

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	1 g Paraformaldehyd, ad 25 ml PBS, pH 7,4
10 x PBS	40 g NaCl, 1 g KCl, 5,75 g Na ₂ HPO ₄ , 1 g NaH ₂ PO ₄ , ad 500ml H ₂ O
Permeabilisierungslösung	100 µg Triton X-100, 0,1 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat, ad 100 ml H ₂ O
Stammlösung Positivkontrolle	0,7884 g Tris HCl, 0,1 g BSA, ad 100 ml H ₂ O, pH 7,5

Tab. 5: RNA-Isolierung, Puffer zur Durchführung

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	10 µl β-Mercaptoethanol, 1 ml RLT Buffer

Tab. 6: Protein-Isolierung, Puffer zur Durchführung

Puffer	Zusammensetzung
Protein-Lyse Puffer	100 µl Cell Culture Lysis Reagent 5x, ad 400 µl H ₂ O

Tab. 7: SDS-Gelelektrophorese, Puffer zur Durchführung

Puffer	Zusammensetzung
10 x Elektrophorese Laufpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS (w/v), ad 500 ml H ₂ O, pH 8,3
1 x Elektrophorese Laufpuffer	50 ml 10 x Elektrophorese Laufpuffer, ad 450 ml H ₂ O
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris Base, 0,4% SDS (w/v), ad 2000 ml H ₂ O, pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris Base, 0,4% SDS (w/v), ad 2000 ml H ₂ O, pH 8,8

Tab. 8: Western-Blot, Puffer zur Durchführung

Puffer	Zusammensetzung
10 x Transferpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, ad 500 ml H ₂ O, pH 8,3
1 x Transferpuffer	50 ml 10 x Transferpuffer, 50 ml Methanol abs., ad 400 ml H ₂ O
Blockierpuffer	500 ml PBS, 1% BSA (w/v), 0,05% Tween 20 (v/v), pH 7,4

3.1.6 Wirksubstanzen

Tab. 9: Test- und Kontrollsubstanzen

Substanz	Hersteller
Povidon K16, 5%	großzügigerweise zur Verfügung gestellt von Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz
Taurolin® 2%	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
rhTRAIL/Apo-2L	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

3.1.7 Antikörper und Färbereagenzien

Tab. 10: Antikörper und Färbereagenzien

Antikörper/Farbstoff	Hersteller
Annexin V-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
c-IAP2 (H-85): sc-7944 GADD 34 (S-20): sc-824 GADD 45α (H-165): sc-797	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
HRP-conjugated Goat Anti-Mouse Immunoglobulin Specific Polyclonal Antibody	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
IκB-α (C-21): sc-371 NIK (H-248): sc-7211 Rho GDIα (A-20): sc-360	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
Propidium Iodid	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

3.1.8 Kits

Tab. 11: Kits

Kit	Hersteller
rh Annexin/FITC Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich
BCA Protein Assay Kit	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
NFκB Family Transcription Factor Assay Kit	Active Motif Europe, Rixensart, Belgien
Nuclear Extract Kit	Active Motif Europe, Rixensart, Belgien
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Taqman Universal PCR Master Mix Protocol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.9 Software

Tab. 12: Software

Bezeichnung	Hersteller
CellQuest Pro Software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GCOS1.4 Software (MAS 5.0)	Affymetrix, UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Data Mining Tool 3.0	Affymetrix, UK Ltd., Buckinghamshire, UK
SPSS Version 14.0	SPSS Incorporation, Chicago, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinie HT1080 erfolgte bei 5% (v/v) CO₂ und 37,0°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Dies gilt für sämtliche im Folgenden genannte Inkubationsschritte im Inkubator, sofern nicht anders angegeben.

3.2.1.1 Auftauen

Die bei -80,0°C im Cryocup gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37,0°C aufgetaut. Nach tropfenweiser Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium und anschließend 1 Min. Standzeit wurde der Inhalt vorsichtig durchmischt und direkt in einen mit 3 ml vorgewärmtem Medium gefüllten Zellkulturflacon überführt.

Passage der Zellen beim Auftauen: P 33#

3.2.1.2 Mediumwechsel

Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte jeden Tag. Für Zellkulturflaschen mit 25 cm² Oberfläche wurden 5 ml verwendet, für Zellkulturflaschen mit 12,5 cm² Oberfläche 2 ml.

3.2.1.3 Splitten

Erreichten die Zellen nach 2-3 Tagen ein konfluentes Wachstum, wurde das Medium abgesaugt und vorgewärmtes Trypsin/EDTA (vgl. Tab. 13) auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 3-5 Min. im Inkubator. Sobald sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten oder durch sanftes Beklopfen des Kulturflaschenbodens abgelöst worden waren, wurde vorgewärmtes Kulturmedium (vgl. Tab. 13) zugegeben. Das Gemisch wurde in ein 15 ml Falcon® Röhrchen überführt und mit 230 g bei 20,0°C für 4 Min zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt, das Pellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und je nach Bedarf ein Anteil der Suspension in neue Kulturflaschen ausgesät – zur Kultivierung oder für Inkubation mit Testsubstanzen. Dies geschah im Verhältnis von 1:5 bis 1:20.

Tab. 13: Trypsinierung, benötigte Volumina

Oberfläche Flacon	Trypsin/EDTA	Medium
12,5 cm ²	1,5 ml	3 ml
25 cm ²	3 ml	6 ml

3.2.1.4 Kryokonservierung

Die Schritte zur Überführung der Kulturzellen in eine Zellsuspension sowie deren Sedimentation in der Zentrifuge entsprechen den oben genannten zum Splitten. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Cryocup überführt und 100 µl steril filtriertes DMSO zugegeben. Die Kryokonservierung erfolgte im Freezing Container bei -80,0°C.

3.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Ergab sich bei Färbung der Zellen (z.B. vor Durchflusszytometrie) aus dem Herstellermanual die Notwendigkeit, mit einer festgelegten Zellzahl zu arbeiten, erfolgte die Auszählung mit mindestens 200 µl Zellsuspension im Sysmex Blutzellanalyse-System. Je nach Bedarf wurde dann mit Nährmedium verdünnt oder erneut zentrifugiert und mit weniger Medium resuspendiert, bis die jeweils benötigte Zellzahl erreicht war.

3.2.2 Testsubstanzen und Dosisfindung

3.2.2.1 Testsubstanzen

Taurolidin (TRD) mit 5% Povidon wurde wie vom Hersteller bereitgestellt genutzt. Eine 5% Povidon-Lösung in korrespondierender Menge diente als Kontrolle für Versuche mit Taurolidin. Rekombinantes humanes TRAIL/Apo2L (TRAIL) wurde nach Herstellerangaben in destilliertem Wasser gelöst, destilliertes Wasser in korrespondierender Menge diente als Kontrolle.

3.2.2.2 Inkubation mit Testsubstanzen

Für die Inkubation mit den Wirkstoffen wurden Zellen im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in Zellkulturflacons ausgesät. Nach 24 Std. erfolgte ein Wechsel des Nährmediums, nach 36 Std. die Zugabe der Testsubstanzen sowie der jeweiligen Negativkontrolle in benötigter Konzentration. Die weitere Inkubation bis zum gewünschten Zeitpunkt geschah im Inkubator.

3.2.2.3 Versuche zur Dosisfindung

Zum Nachweis einer Apoptoseinduktion durch die Wirkstoffe und zur Ermittlung der Dosis mit dem stärksten apoptoseinduzierenden Effekt wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen jeweils einer Testsubstanz inkubiert und das Auftreten apoptotischer Vorgänge im Durchflusszytometer gegen eine Kontrolle gemessen. Um zeitliche Abhängigkeiten zeigen zu können, erfolgten Messungen jeweils zu 4 unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 6, 12 und 24 Std.). Jede Messung wurde drei Mal mit aufeinanderfolgenden Passagen wiederholt.

Zusätzlich wurde ein orientierender Versuch durchgeführt, um mögliche synergistische Effekte der Kombination beider Wirksubstanzen auch schon bei niedrigen Dosen TRAIL auszuloten. Hierfür wurde die wirksamste Konzentration TRD mit unterschiedlichen Konzentrationen TRAIL inkubiert und zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten (6, 12 und 24 Std.) gemessen. Die verwendeten Konzentrationen und Zell-Passagen sind in Tab. A8 und A9 aufgeführt.

3.2.2.4 Finale Versuche zur Apoptoseinduktion

Zur Darstellung synergistischer Effekte der Substanzkombination im direkten Vergleich zu den Einzelsubstanzen wurden drei konsekutive Passagen mit den Substanzen in ausgewählter Konzentration – als Einzeldosis sowie in Kombination – inkubiert und jeweils zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 6, 12 und 24 Std.) gemessen. Folgende Konzentrationen und Passagen wurden verwendet:

Tab. 14: finale Versuche, Konzentrationen und Passagen

Passage	TRAIL	TRD	TRAIL + TRD
P 41#	50 ng/ml	250 µmol/l	50 ng/ml + 250 µmol/l
P 42#	50 ng/ml	250 µmol/l	50 ng/ml + 250 µmol/l
P 43#	50 ng/ml	250 µmol/l	50 ng/ml + 250 µmol/l

3.2.3 Durchflusszytometrie

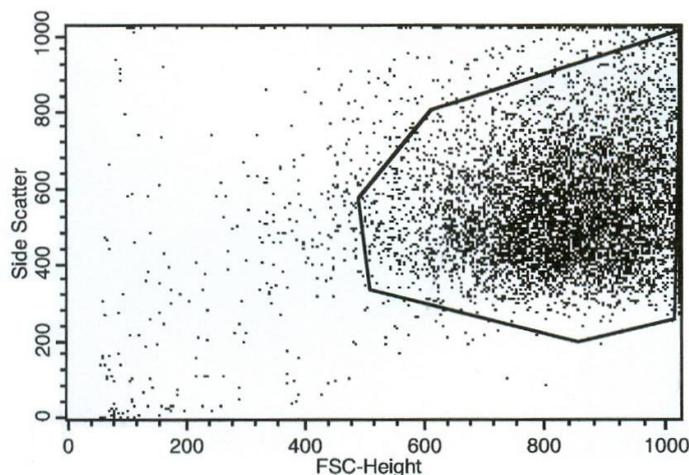
Mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Quantifizierung des apoptoseinduzierenden Effekts der Wirksubstanzen TRAIL, TRD und deren Kombination. Es wurde unterschieden zwischen vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen.

3.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting, registrierter Handelsname der Firma Becton Dickinson), erlaubt die quantitative Bestimmung von Zellen oder Partikeln und kann mit Hilfe von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen weitere Aussagen über deren

physikalische und molekulare Eigenschaften machen. Vom Prinzip werden in einem Überdrucksystem in Lösung befindliche Zellen aneinanderreihend und einzeln an einem gebündelten Argon- (488 nm) und Diodenlaserstrahl (630 nm, 200 mW) vorbeigeführt. Detektoren (Photomultiplier) registrieren dabei zwei Arten von Streulicht: das Vorwärtsstreulicht (FSC „forward scatter“) nach Beugung im flachen Winkel – abhängig vom Zellvolumen – und das Seitwärtsstreulicht (SSC „side scatter“), Brechung im 90° Winkel – das mit der Granularität (Größe des Zellkerns, intrazelluläre Bestandteile) korreliert.

Die Streulicht-Messergebnisse werden in einem sog. Dot-Plot (Abb. 2) dargestellt,



üblicherweise mit FSC (Zellgröße) auf der x-Achse und SSC (Granularität) auf der y-Achse. Analog können detektierte Fluoreszenzsignale dargestellt werden.

Abb. 2: Durchflusszytometrie, Dot-Plot

Mit Hilfe von Farbstoffen oder fluoreszierender Antikörper gegen z.B. DNA/RNA oder Oberflächenmoleküle sind zusätzliche Aussagen möglich. Die nach Anregung im charakteristischen Wellenlängenbereich emittierte Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge gebundenen Antikörpers.

In dieser Arbeit wurden der grün fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und das rot fluoreszierende Propidium Iodid (PI) verwendet. FITC, ein häufig gebrauchter Farbstoff, besitzt ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum von 520-530 nm, es wird an das Protein Annexin V gekoppelt verwendet. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 495 nm, das Emissionsmaximum bei 639 nm. Annexin V ist ein calciumabhängiges Protein, das hauptsächlich an den Zellmembranbestandteil Phosphatidylserin (PS) bindet. Das nicht membrangängige Annexin kann nur binden, wenn PS auf die Außenseite der

Zellmembran transloziert – dies geschieht regelhaft in apoptotischen Zellen. Im Rahmen der Nekrose wird die Zellmembran durchlässig für größere Moleküle – PS ist nun ebenfalls für Annexin zugänglich. Um nun apoptotische von nekrotischen Zellzuständen unterscheiden zu können, wird zusätzlich der rote Fluoreszenzfarbstoff PI eingesetzt. Dieser bindet an dsDNA. Unterläuft eine Zelle Nekrose und verliert die Zellmembran ihre Integrität, wird sie durchlässig für den Farbstoff. Demnach lassen sich folgende Zustände unterscheiden:

Tab. 15: Durchflusszytometrie, mögliche Zellzustände nach Färbung mit FITC/Annexin und PI

Zelle	FITC/Annexin	PI
vital	-	-
apoptotisch	+	-
nekrotisch	+	+

3.2.3.2 Zellaufbereitung und Messverfahren

Nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen bis zu den genannten Zeitpunkten wurden schwimmende Zellen mit dem Nährmediumüberstand abgenommen und in 15 ml Falcon® Röhrchen überführt, adhärente Zellen durch Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA für 3-5 Min. im Inkubator und ggf. sanftes Beklopfen des Flacons gelöst. Nach Zugabe von 2 ml vorgewärmtem Kulturmedium wurde die Zellsuspension dem Nährmediumüberstand beigefügt und mit 230 g bei 20,0°C für 4 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 195 µl eiskaltem Binding Buffer (rh Annexin V-FITC Kit) resuspendiert und in 1,5 ml Cups überführt. Die Zellzahl wurde wie unter 3.2.1.5 beschrieben auf $2-5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Nach Zugabe von 5 µl Annexin/FITC und kurzem Durchmischen auf dem Vortex wurde für 10 Min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben 1 Min. bei 2.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und nach Resuspension in entsprechender Menge Binding Buffer in Falcon® Polystyrene round bottom tubes überführt. Anschließend wurden 10 µl PI

hinzugegeben, nochmals kurz durchmischt und sofort im Durchflusszytometer gemessen. Pro Messung wurden 20.000 Zellen gezählt. Dot-Plots und Histogramme wurden mittels CellQuest Pro Software ausgewertet.

3.2.3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms SPSS Version 14.0. Die ermittelten Prozentanteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden als Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) der drei Versuchsdurchführungen dargestellt. Zum Vergleich der Versuchsgruppen (Einzelsubstanzen in verschiedenen Dosierungen und Einzelsubstanz gegenüber kombinierter Behandlung) wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one way ANOVA) über alle Zeitpunkte (Tukey) durchgeführt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen wie folgt angegeben:

*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,005$, * $p \leq 0,05$.

3.2.4 Optische Verfahren

3.2.4.1 Lichtmikroskopie

Die Morphologie adhärenter und in Kulturmedium suspendierter Zellen sowie Fortschritt des Zellwachstums wurden mittels Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Axiovert 25) untersucht und photodokumentiert.

3.2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung apoptotischer Vorgänge wurden Zellen inkubiert und vorbereitet wie für das TUNEL-Assay (vgl. 3.2.5), jedoch mit 5 μ l Annexin V-FITC und 10 μ l PI gefärbt. Unmittelbar nach dem Färben erfolgte die Photodokumentation im Fluoreszenzmikroskop (Leica, DM4000B).

3.2.5 TUNEL Assay

Die Detektion und Visualisierung von DNA-Strangbrüchen durch apoptotische Vorgänge erfolgte im TUNEL-Assay.

3.2.5.1 Prinzip des TUNEL Assays

Die TUNEL Methode (TdT-mediated dUTP nick end labeling) dient dem Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen („nicks“) speziell in apoptotischen Zellen. Freigelegte Hydroxylgruppen an den Bruchenden können mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotid Transferase (TdT), welche den Einbau fluoresceinmarkierter Nukleotide (Desoxyuridintriphosphat, dUTP) katalysiert, in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Permeabilisierung ermöglicht das Vordringen von dUTP in den Kern, damit dabei keine DNA austritt, müssen die Zellen zuvor fixiert werden.

3.2.5.2 Zellaufbereitung

Die Inkubation der Zellen mit den Test- und Kontrollsubstanzen einzeln und in Kombination erfolgte für 2 und 4 Std., zusätzlich wurden zwei Flacons ohne zusätzliche Wirksubstanzen als spätere Positiv- bzw. Negativkontrolle angelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Überstände und anhaftende Zellen wie für die Durchflusszytometrie aufbereitet und zu einem Pellet abzentrifugiert. Die Resuspension des Pellet erfolgte mit 400 µl PBS. Die Zellsuspension wurde auf 10.000 Zellen/200 µl eingestellt und mittels Cytospin Probenkammern in 5 Min. bei 800 rpm in der Zentrifuge (Cytospin 3) auf Cytospin Objektträger aufgebracht.

3.2.5.3 Durchführung

Zur Durchführung wurde das In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die mit Zellen beschichteten Objektträger wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und für 1 Std. bei Raumtemperatur in Fixierlösung eingebettet. Nach zwei Waschgängen mit PBS folgte eine zweiminütige Inkubation in Permeabilisierungslösung auf Eis, anschließend das Entfernen der Permeabilisierungslösung durch drei Waschschriffe mit PBS. Negativ- und Positivkontrollen wurden hergestellt (vgl. Tab. A10). Für die übrigen Proben wurde das TUNEL-Reaktionsgemisch in einer Verdünnung von 1:10 (50 µl Enzyme Solution, 450 µl Label Solution) angesetzt, jeweils 50 µl auf die Proben pipettiert und diese für 1 Std. bei 37,0°C in Dunkelheit inkubiert. Für homogenes Einwirken des Reaktionsgemisches und gegen Austrocknen der

Proben wurden diese mit Parafilm abgedeckt und während der Inkubation in einer Feuchtkammer gelagert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS und die anschließende Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop.

- Extinktion: 450-500 nm
- Detektion: 515-565 nm

3.2.6 Proliferationsassay (BrdU)

Um Einflüsse der Wirksubstanzen auf die Zellproliferation nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde ein Zellproliferations-ELISA mittels 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) durchgeführt.

3.2.6.1 Prinzip des BrdU-ELISA

In proliferierenden Zellen kommt es während der DNA-Synthese zum Einbau des Thymidin-Analogons BrdU. Durch Zufügen eines mit Peroxidase (POD) gekoppelten Antikörpers gegen BrdU kommt es zu einer spezifischen Substratreaktion, deren Produkt spektrophotometrisch bestimmt werden kann und sich proportional zur Menge neu synthetisierter DNA und damit zur Proliferation der Zellen verhält.

3.2.6.2 Zellaufbereitung und Durchführung

Die Zellen wurden auf 96-wells ausgesät und für 8 Std. mit den Wirk- und Kontrollsubstanzen inkubiert. Je 8 wells ohne Zugabe von Wirk- oder Kontrollsubstanzen fungierten später als Negativ- bzw. Eichkontrollen (vgl. Tab. A11).

Die Durchführung des Proliferationsassay erfolgte mittels Cell Proliferation ELISA, BrdU nach Vorgaben des Herstellers. Dazu wurde nach Ablauf der Inkubationszeit BrdU dem Medium zugegeben und weitere 2 Std. im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, die DNA denaturiert und POD-gekoppelte Antikörper gegen BrdU zugeben (Inkubationszeit: 90 Min.), welche sich an eingebautes BrdU anlagern. Nach Anstoßen der spezifischen Substratreaktion durch Zugabe von Substrat erfolgte die spektrophotometrische Messung im Microplate Reader bei 370

nm. Der Versuch wurde dreifach durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) dargestellt.

3.2.7 Untersuchungen auf mRNA Ebene

Zum Nachweis von Einflüssen der Wirksubstanzen auf Ebene der Genexpression wurde RNA für eine spätere Verwendung im Oligonukleotid Microarray isoliert. Hierfür wurden die Zellen 2 Std. mit den Wirksubstanzen inkubiert.

3.2.7.1 RNA-Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben.

3.2.7.1.1 Prinzip

Nach Aufschluss von Zell- oder Gewebeproben durch stark denaturierenden Guanidin-Thiocyanat Lyse-Puffer (RLT) wird die RNA durch Zentrifugation an eine Silikagelmembran gebunden und in mehreren Waschschritten aufgereinigt. Spezielle Puffersysteme und Ethanol (70%) verstärken dabei die selektive Bindung der RNA an die Membran, eventuell vorhandene DNA wird mittels DNase I fragmentiert und ausgewaschen

3.2.7.1.2 Zellaufbereitung und Durchführung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden schwimmende Zellen mit dem Überstand in 15 ml Falcon® Röhrchen überführt und für 4 Min. bei 20,0°C und 230 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 μ l Lyse-Puffer resuspendiert. Adhärente Zellen wurden mit 250 μ l Lyse-Puffer benetzt und mit dem Zellschaber gelöst, dann zu den Zellen aus dem Überstand gegeben und die gesamte Suspension durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer 0,9 mm Kanüle homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol 70% wurden die Proben in RNeasy Mini Columns überführt und nach Herstellerprotokoll aufgereinigt (s. Tab. A12). Ein on-column DNA-Verdau erfolgte als Zwischenschritt mit dem RNase-Free DNase Set nach

Anweisung des Herstellers. Die eluierte RNA konnte bei $-80,0^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.2.7.2 Oligonukleotid Microarray

Die Durchführung der Microarrays und ihrer statistischen Auswertungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), IFZ der Universität Duisburg-Essen, Deutschland.

3.2.7.2.1 Prinzip

Im Microarray ist es möglich, die Expression von mehreren tausend Genen gleichzeitig zu messen. Oligonukleotid-Microarrays bestehen aus einem Trägermaterial mit einer Vielzahl von Testfeldern (Spots), auf die kurze, synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Sonden, englisch ‚probes‘) aufgebracht werden. Ein Sondensatz (Probeset) besteht aus 16 Abschnitten eines bestimmten Gens und repräsentiert dieses. Jede Sonde eines Probesets liegt paarweise vor, als ‚perfect match‘ (PM) und als ‚miss match‘ (MM). Die PM-Sonde ist 100% komplementär zur repräsentierten Gensequenz, die MM-Sonde enthält mittig ein fehlbindendes Nukleotid. In der Auswertung wird vom PM- das unspezifische MM-Hybridisierungssignal abgezogen. Das Verhältnis (detection call) ergibt, ob ein Transkript als zuverlässig vorhanden (‚present‘), nicht vorhanden (‚absent‘) oder grenzwertig (‚marginal‘ – vorhanden, aber nicht zuverlässig) gewertet wird. Diese Auswertungsweise erhöht die Spezifität der Messung. Auch Signale durch Kreuzhybridisierung und Hintergrundfluoreszenz können mittels der MM-Proben berechnet und korrigiert werden.

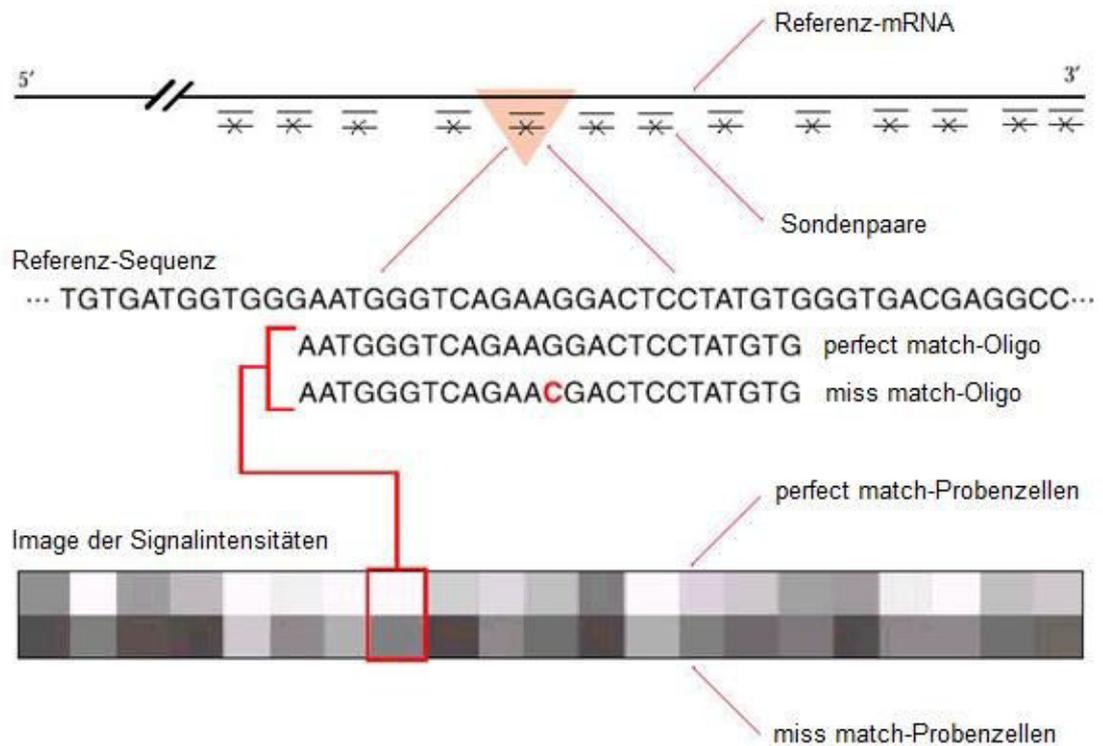


Abb. 3: Aufbau eines GeneChip-Array

(modifiziert nach: <http://www.bioinf.mdc-berlin.de/~schober/Microarray.doc>)

Die Ziel-RNA (Target) wird mit Hilfe eines Primers (T7-d(T)21) und des Enzyms Reverse Transkriptase zunächst in Einzelstrang-cDNA konvertiert, der komplementäre Strang dann durch DNA-Polymerase und RNase H synthetisiert. Nach Umschreibung in biotinylierte Antisense-cRNA und Vervielfältigung wird diese fragmentiert und zur Hybridisierung mit den Sonden gebracht. Nicht gebundene Targets werden ausgewaschen, gebundene mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin gefärbt. Die Detektion mittels Laser erfolgt im Microarray-Scanner. Zur Auswertung der großen Datenmenge werden spezielle Software verwendet und Abgleiche mit Datenbanken im Internet vorgenommen.

3.2.7.2.2 RNA-Qualität

Die Beurteilung der RNA-Integrität erfolgte im Agilent 2100 Bioanalyzer mittels Lab-on-a-Chip-Elektrophorese und anschließender Laserdetektion der farbmarkierten RNA.

3.2.7.2.3 Durchführung

Für das Mikroarray wurde eine GeneChip Platte unter Anwendung eines Standardprotokolls für Probenaufbereitung und Hybridisierung genutzt. Die Auswahl der Probesets (insgesamt 621) erfolgte nach Relevanz der repräsentierten Gene für die apoptotische Signaltransduktion nach Gene Ontology. Die Gesamt-RNA (5 µg) wurde in biotinylierte cRNA konvertiert, aufgereinigt, fragmentiert und auf HG-U133Plus_2.0 Mikroarrays aufgebracht. Diese wurden gewaschen, nach Herstellerangaben gefärbt und im GeneChip Scanner 3000 untersucht. Alle Schritte wurden nach den Angaben im Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual Version 2 durchgeführt.

3.2.7.2.4 Auswertung

Image Analyse

Die primäre Image-Analyse wurde mit der Affymetrix GCOS1.4 Software (MAS 5.0) durchgeführt. Bestimmt wurden numerische Signalintensitäten – ein relatives Maß für die Häufigkeit des Transkripts in der analysierten Probe – sowie die ‚detection calls‘. Um Abweichungen in Menge und Qualität der cRNA-Proben, Abbaueffekte und andere experimentelle Variablen zu kompensieren, erfolgte für alle Arrays eine Normalisierung der detektierten Intensitäten auf einen Durchschnittswert von 1000 Einheiten.

Comparison Analysis

Der paarweise Vergleich behandelter Zellen (experimenteller Array) untereinander sowie mit den Kontrollzellen (Kontroll-Array) erfolgte mittels o.g. Software, welche die Signifikanz (change p-value) jeder Veränderung der Genexpression (change) auf Grundlage eines Wilcoxon Rangsummentests ermittelte. Zur Datenfilterung wurde das Affymetrix Data Mining Tool 3.0 verwendet. Die Messergebnisse wurden als Signal Log Ratio (SLR) – das logarithmische Verhältnis der Signale zueinander – ausgedrückt, da die Expression eines Gens nur im Vergleich zwischen zwei Versuchsgruppen (z.B. TRD vs. Kontrolle) beurteilt werden kann.

Heat Map

Die Heat Map veranschaulicht farblich die gemessenen Expressionsunterschiede der apoptoseassoziierten Probesets des Microarray-Chips, dargestellt als SLR (vgl. Ergebnisse – Abb. 19 und Abb. A10).

Clustering

Die Datensätze werden weiterhin durch sogenanntes ‚Clustering‘ geordnet. Clustering beschreibt eine gebräuchliche Methode der statistischen Datenanalyse und ist eine mögliche Form des sogenannten Data Mining – der Versuch, in einer Datenmenge Muster aufzudecken. Beim Clustering gibt es keine vordefinierten Gruppen, vielmehr wird nach Ähnlichkeiten der Proben gesucht, anhand derer die Daten in Gruppen eingeteilt werden können. Hierarchisches Clustering – wie hier angewendet – bedeutet Gruppenbildung auf mehreren Ebenen: Entweder werden kleinere Gruppen nach ähnlichen Merkmalen zu jeweils übergeordneten zusammengefasst (agglomerativ), oder eine große Gruppe wird nach und nach in Untergruppen aufgeteilt (divisiv). Es ergibt sich ein baumartiges Muster, ein Dendrogramm. (vgl. Ergebnisse – Abb. A10(b)).

3.2.7.3 Datenvalidierung in der Real-time-PCR

Die Validierung der Daten aus dem Microarray wurde für ausgewählte Gene (ARHGDI A, BIRC3, GADD34, HSPA1A, HSPA1B, MAP3K14, MAP3K1) mittels Real-Time-PCR (rtPCR) durchgeführt. Es handelte sich um solche, die im Microarray die differenzierteste Regulation aufwiesen.

Die Gesamt-RNA (2 µg) wurde mittels High Capacity cDNA Archive Kit gemäß Herstellervorgaben in cDNA umgeschrieben. Die rtPCR erfolgte im ABI Prism 7900HT Sequence Detector unter Verwendung des Taqman Universal PCR Master Mix Protocol mit 20 µl Endvolumen (10 µl Master Mix, 1 µl jeweiliges Assay, 9 µl cDNA -Suspension in äquivalenter Menge zu 2 ng RNA). Alle verwendeten Reagenzien und Assays (ARHGDI A: Hs00976924 g1, BIRC3: Hs00154109 m1, GADD34: Hs00169585 m1, HSPA1A: Hs00359163 s1, HSPA1B001040501 +sH, MAP3K14: Hs01089753, MAP3K1: Hs00394890 m1, GAPDH: Hs99999905_m1) wurden bei Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) erworben. Die Amplifikation erfolgte

gemäß nachstehendem Protokoll: 10 Min. bei 95°C, anschließend 40 Zyklen zur Denaturierung bei 95°C (15 Sek.) und Annealing/Elongation bei 60°C (1 Min.). Alle Versuche wurden zweifach durchgeführt und nach der $\Delta\Delta$ CT Methode (relative Quantifizierung) analysiert. Als Referenz diente humanes GAPDH (glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

3.2.8 Untersuchungen auf Protein-Ebene

Um die Funde veränderter Genexpression auch auf Proteinebene zu beurteilen, wurden Western Blots in SDS-page Gel durchgeführt. Wir konzentrierten uns dabei auf jene Proteine, deren Expression auf mRNA-Ebene im Microarray am stärksten verändert war. Dazu wurde zunächst das Gesamtprotein isoliert und die Konzentrationen mittels BCA-Methode bestimmt. Folgende Antikörper (Kaninchen) kamen im Western Blot zum Einsatz: Rho GDI_ / ARHGDI (C-21), GADD 45_ (H-165), c-IAP2 / BIRC3 (H-85), GADD 34 / PPP1R15A (S-20), NIK / MAP3K14 (H-248), und I_B_ / NFKBIA (C-21).

3.2.8.1 Prinzip

Das Gesamt-Protein wird durch Lyse der Zellen mit Gewinnung des Proteins in gelöster Form isoliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine nach Größe und Molekulargewicht erfolgt deren Übertragung auf eine Filtermembran (Blotten) und Detektion mittels Primär- und Sekundär-Antikörpern (Immunoblotting).

3.2.8.2 Zellaufbereitung und Proteinisolierung

Nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Substanzen wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (2 und 4 Std.) das Gesamtprotein isoliert. Hierfür wurden schwimmende Zellen mit dem Überstand abgenommen, adhärente Zellen mittels Trypsinierung abgelöst und der Zellsuspension hinzugefügt, diese dann abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Proben mit 50 µl Protein-Lyse-Puffer für jeweils 1Std. auf Eis inkubiert; anschließend die Zellüberreste abzentrifugiert (1 Min., 13.000 rpm)

und der die gereinigten Proteine enthaltende Überstand bis zur Weiterverwendung in frischen Eppendorf Cups bei -80° gelagert.

3.2.8.3 Proteingehaltbestimmung (BCA Protein Assay)

3.2.8.3.1 Prinzip

Die Proteingehaltbestimmung erfolgte mittels Extinktionsmessung im Photometer nach der BCA Methode. Diese erweitert die bekannte Biuret-Reaktion (Reduktion von Kupfer-Ionen am Protein) um die Bildung violetter Komplexe aus dem Chelatbildner Bicinchoninsäure (BCA) und Cu^{+} -Ionen. Die Chelat-Menge verhält sich proportional zur Proteinkonzentration.

3.2.8.3.2 Durchführung

Dazu wurde das BCA Protein Assay Kit nach Anweisung des Herstellers verwendet. Jeweils $25 \mu\text{l}$ der Proben und der gemäß Protokoll erstellten BSA Standards wurden mit $200 \mu\text{l}$ Working Reagent (Pierce Lösungen A + B, Mischungsverhältnis 50:1) in eine 96-well Microtiterplatte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei $37,0^{\circ}\text{C}$ wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der BSA-Standardkurve errechnet. Die aliquotierten Proben wurden bei $-30,0^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.8.4 Gelelektrophorese

3.2.8.4.1 Prinzip

Die Größenauffrennung der zuvor denaturierten Proteine geschieht in einer Gelmatrix entlang eines elektrischen Gradienten. SDS denaturiert Proteine und überdeckt deren Eigenladung, die Migrationsgeschwindigkeit ist dann nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig. Die Gelmatrix besteht aus Acrylamid-Monomeren, die in Anwesenheit freier Radikale lange Ketten formen, Bis-Acrylamid quervernetzt diese (und bestimmt so die Porengröße). Der Radikalbildner APS initialisiert die Polymerisierung, TEMED dient als Katalysator. Unterschiedliche Polyacrylamid-Konzentrationen in Sammel- und Trenngel ermöglichen die Konzentrierung und bessere Auftrennung der Proteine.

3.2.8.4.2 Durchführung

Proteindenaturierung

Die Proteinproben wurden unter Zugabe von 2x Laemmli-Puffer 3 Min. bei 95°C denaturiert. Der Puffer enthält Bromphenolblau, um später den Lauf der Proben im Gel besser verfolgen zu können.

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Gele wurden aus Acrylamid/ Bis solution 30%, TEMED und APS sowie den entsprechenden Puffern hergestellt (Tab. 16) und als Flachgele im Mini Protean II System (9,5x6 cm) gegossen. Dazu wurde zunächst das Trenngel gegossen und während der Gerinnung (30 Min.) mit Elektrophorese-Laufpuffer überschichtet. Nach Entfernen des Puffers und Angießen des Sammelgels wurde der Taschenformer platziert und weitere 30 Min. inkubiert.

Tab. 16: SDS-PAGE, Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

(PAA-Anteil in %)

Trenngel (12,5%)		Sammelgel (6%)	
Aqua dest.	5 ml	Aqua dest.	2,75 ml
Polyacrylamid (PAA)	6,25 ml	Polyacrylamid (PAA)	1 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	Sammelgelpuffer	1,25 ml
APS 10%	100 µl	APS 10%	100 µl
TEMED	20 µl	TEMED	20 µl

Nach Einhängen der Gele in die Elektrophorese-Apparatur und Auffüllung der Kammern mit Elektrophorese-Laufpuffer wurden eingeschlossene Luftblasen durch Spülung entfernt und die Proteine in einer Konzentration von 40 µg/Probe in die Sammelgel-Taschen geladen. Als Proteingrößenstandard wurde der Precision Plus Protein Standard, Kaleidoscope verwendet. Die Laufzeit betrug 2 Std. bei 100-120 V und Raumtemperatur.

3.2.8.5 Western Blot

Um nach der SDS-PAGE die im Gel aufgetrennten Proteine auswertbar zu machen, wurden diese elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen. Das Methanol im Transferpuffer (Tab. 8) entfernt SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen und erhöht damit die Bindung der Proteine an die Membran. 7 Filterpads, sowie 2 Whatman Filterpapiere, wurden in Transferpuffer getränkt; die PVDF Membran zunächst für ca. 30 Sek. mit Methanol absolut benetzt, mit Aqua bidest. gewaschen und dann ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Die Beladung der Western Blot Kammer geschah luftblasenfrei in unten stehender Reihenfolge:

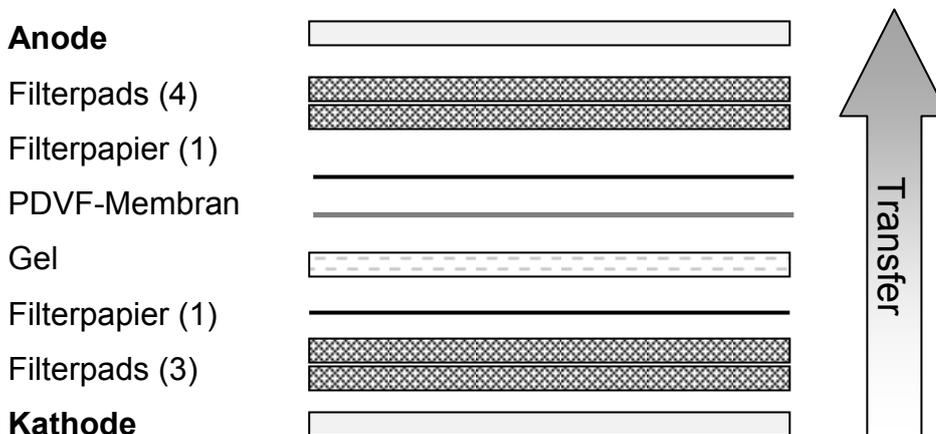


Abb. 4: Western Blot, Beladung der Blottingkammer

Im Anschluss wurde die Blottingkammer mit Transferpuffer aufgefüllt und für 1 Std. ein elektrisches Feld (25 V, 2,5 mA/cm²) angelegt.

3.2.8.6 Standard Immuno Detection

Zum Nachweis der spezifischen Proteine wurden Primärantikörper eingesetzt und mittels Horseradish Peroxidase (HRP) markiertem Zweitantikörper visualisiert. HRP oxidiert das Substrat Luminol (c-Diacylhydrazid) unter Emission von Licht, welches auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Die Immuno-Detektion erfolgte mit Hilfe der ECL Plus Western Blotting Detection Reagents.

Die Sättigung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte durch Inkubation der Membran in Blockierpuffer (Tab. 8) für 24 Std. bei 4,0°C. Im Anschluss wurde die Membran mit spezifischem Erstantikörper, der entsprechend mit Blockierpuffer verdünnt wurde (Verhältnis 1:2.000), für 1 Std. bei Raumtemperatur im Biometra Mini Hybridisierungssofen unter Rotation inkubiert. Es folgten vier Waschschriffe mit jeweils ca. 15 ml PBS auf dem Schüttler für je 10 Min. Der Zweitantikörper wurde mit Blockierpuffer auf 1:8.000 verdünnt und ebenfalls für 1 Std. inkubiert. Nach weiteren vier Waschschriffen mit PBS wurde die Membran gleichmäßig für 5 Min. mit ECL Entwicklerlösung benetzt, anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und lichtgeschützt in einer Röntgenkassette gelagert. Die Belichtung des Röntgenfilms erfolgte für 1-180 Sek. in der Dunkelkammer. Entwickelt wurde mittels M35 X-Omat Processor.

3.2.9 Transkriptionsfaktor-Aktivität (NFkB-activity-ELISA)

3.2.9.1 Prinzip

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFkB wurde mittels ELISA bestimmt und quantifiziert. Dafür wurde Zellkernextrakt hergestellt und auf 96-well Platten aufgebracht, die mit einem Oligonukleotid beschichtet sind. Dieses besitzt eine spezifische Bindungsstelle für den aktivierten Transkriptionsfaktor. Mit Primärantikörpern gegen die Untereinheiten des gebundenen Transkriptionsfaktors (p50, p52, p65, c-Rel, RelB) wird dieser detektiert, ein an Horseradish-Peroxidase (HRP) gebundener Zweitantikörper vermittelt das photometrisch analysierbare Signal (readout).

3.2.9.2 Kernextraktion

Kernextrakt wurde aus Zellen gewonnen, welche zuvor für 4 Std. mit den verschiedenen Substanzen behandelt worden waren. Dazu wurde das Nuclear Extract Kit gemäß Vorgaben des Herstellers verwendet. Nach Inkubation mit den Wirk- und Kontrollsubstanzen wurden die Zellen in eiskaltem PBS resuspendiert. Phosphatase-Inhibitoren verhinderten weitere Modifikation des Proteins durch Proteolyse u.a., anschließende Überführung in eine hypotonische Pufferlösung bewirkte Schwellung der Zellen und

Fragilität der Plasmamembran. Zugabe von Detergens führte nun zum Austritt der zytoplasmatischen Proteinfraction, welche mit dem Überstand entfernt werden konnte. Es folgte die Lyse der verbleibenden Zellkerne unter Schutz durch Protease-Inhibitoren.

3.2.9.3 ELISA

Die Durchführung geschah mit Hilfe des TransAM™ NFκB Family Transcription Factor Assay Kit nach Herstellerangaben. Die 96-well NFκB Assay Plate wurde mit 30 µl/well Complete Binding Buffer befüllt (CBB). Der zuvor präparierte Kernextrakt wurde in CBB gelöst und 20 µl/well der Suspension (entsprechend 2-20 µg Extrakt/well) appliziert. Die Kontrollen wurden erstellt gemäß Tabelle 17:

Tab. 17: NFκB-ELISA, Kontrollen

Kontrolle	Inhalt	Ergebnis
Positivkontrolle	2 µl Raji Kernextrakt (5 µg) auf 18 µl CBB/well	volle Antikörper-Bindung
Blank	20 µl CBB/well	keine Antikörper-Bindung

Es folgte eine Reihe von Wasch- und Inkubationsschritten zum Aufbringen des Primär- und Sekundär-Antikörpers (Tab. A13). Durch Zugabe der Developing solution wurde die Farbentwicklung initiiert und nach entsprechender Inkubation durch Zugabe von Stop solution wieder unterbunden. Die Auswertung erfolgte unmittelbar im Microplate reader.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion und Quantifizierung apoptotischer Vorgänge

4.1.1 Durchflusszytometrie

Für die Versuche wurden humane Fibrosarkomzellen (HT1080) ausgesät und nach 36 Std. mit den Wirksubstanzen TRAIL, TRD oder beiden in Kombination inkubiert. Als Kontrolle wurde für TRD Povidon K16 (5%, gelöst in destilliertem Wasser) eingesetzt, für TRAIL destilliertes Wasser. Mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten, an Phosphatidylserin bindenden Proteins Annexin/FITC und des dsDNA Farbstoffs Propidium Iodid (PI) erfolgte die Differenzierung zwischen apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen.

4.1.1.1 Apoptoseinduktion durch TRAIL als Einzelsubstanz

Um die apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL nachzuweisen und die wirksamste Konzentration sowie den Zeitpunkt der maximalen Apoptoseinduktion zu erfassen, wurden die Zellen analog zu den Versuchen mit TRD jeweils dreimal mit verschiedenen TRAIL-Konzentrationen (10, 50, 100 und 500 ng/ml) inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten (nach 2, 6, 12 und 24 Std.) gemessen. Tab. A14 zeigt die ermittelten Prozentanteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen (als Mittelwerte der drei konsekutiven Messungen).

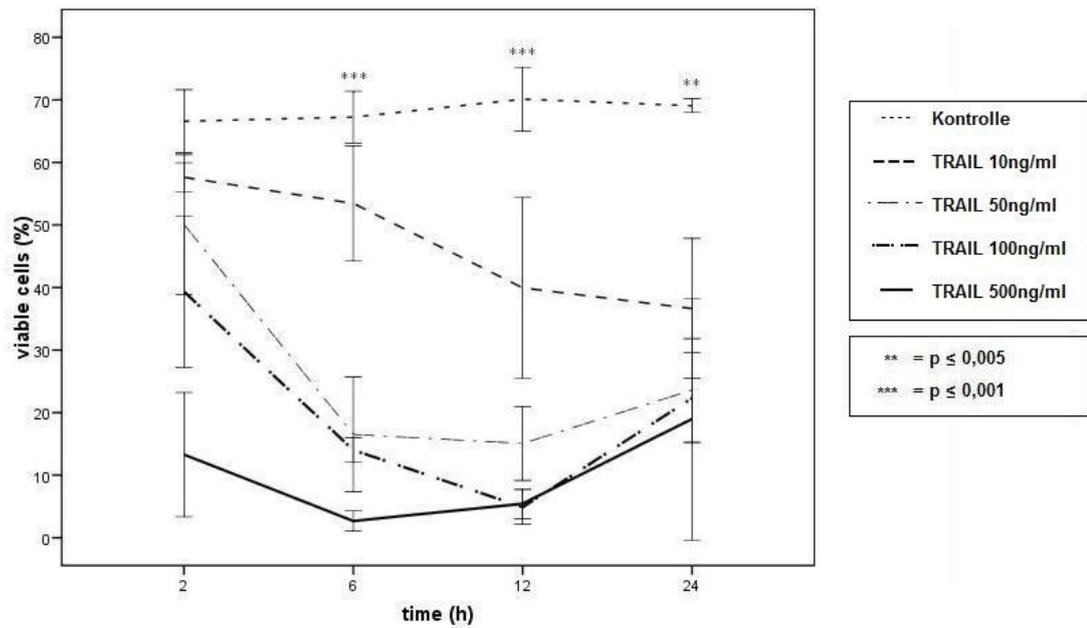


Abb. 5: Reduktion vitaler Zellen durch TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml)

Signifikanzniveau angegeben für TRAIL 50 ng/ml vs. Kontrolle

4.1.1.1.1 Vitale Zellen

TRAIL als Einzelsubstanz reduziert signifikant die Zahl lebender HT1080 Zellen. Die stärkste Reduktion vitaler Zellen (4,89%) wurde nach 12 Std. bei einer Konzentration von 100 ng/ml beobachtet ($p < 0,001$). TRAIL 10 ng/ml zeigte sich weniger effektiv in der Reduktion lebender Zellen als die übrigen drei Konzentrationen, ein signifikantes Maß wurde erst nach 12 ($p < 0,005$) bzw. 24 Std. ($p < 0,05$) erreicht.

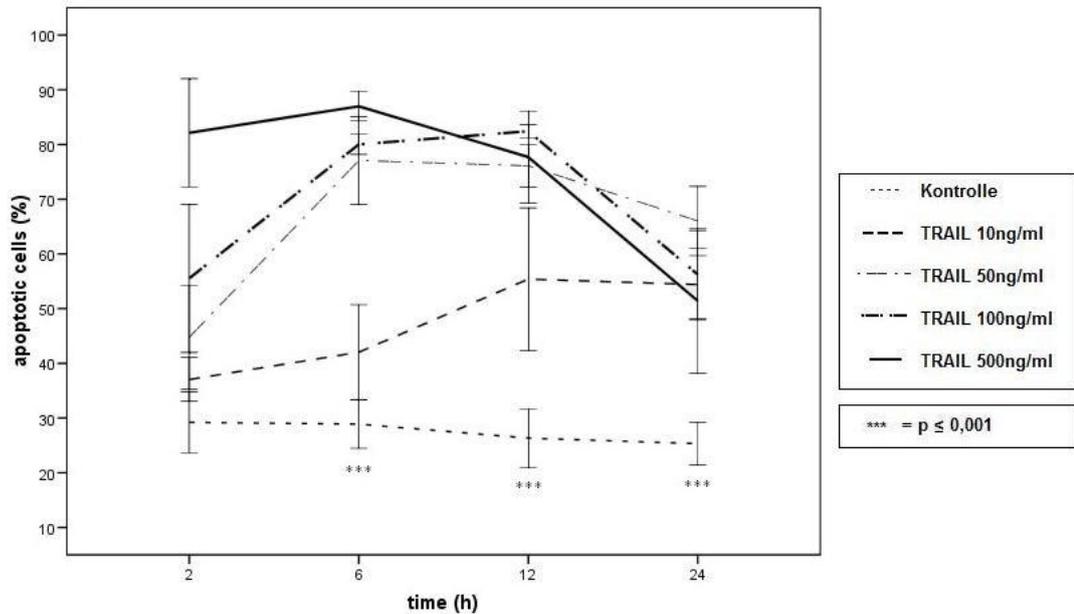


Abb. 6: Induktion von Apoptose durch TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml)

Signifikanzniveau angegeben für TRAIL 50 ng/ml vs. Kontrolle

4.1.1.1.2 Apoptose

TRAIL induziert signifikant Apoptose in humanen HT1080 Fibrosarkomzellen. Die Konzentrationen 100 ng/ml ($p < 0,05$) und 500 ng/ml ($p < 0,001$) lösten in signifikantem Maß frühe Apoptose aus (55,55% und 82,14% nach 2 Std.). TRAIL 50 ng/ml (77,08% nach 6 Std.) wies eine ähnlich starke Wirkung auf ($p < 0,001$). Die apoptosefördernde Auswirkung hielt hier länger an, als in der Gruppe mit 100 bzw. 500 ng/ml.

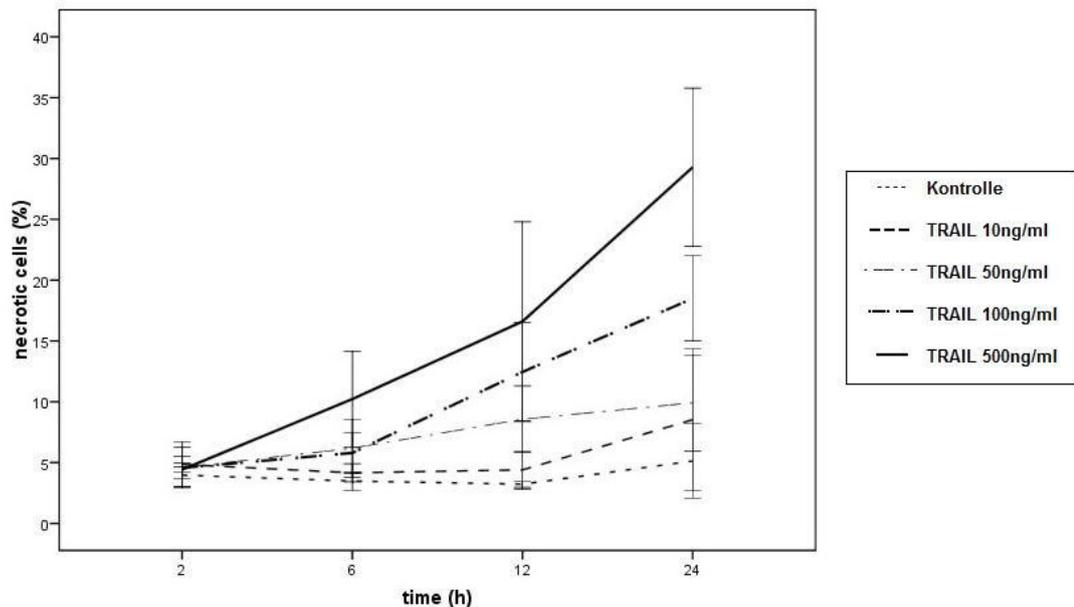


Abb. 7: Induktion von Nekrose durch TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml)

Signifikanzniveau angegeben für TRAIL 50 ng/ml vs. Kontrolle

4.1.1.1.3 Nekrose

TRAIL in den Konzentrationen 100 ($p < 0,05$) und 500 ng/ml ($p = 0,001$) führte nach Apoptoseinduktion zu einer signifikanten Zunahme nekrotischer Zellen. TRAIL 50 ng/ml induzierte bei vergleichbaren Apoptoseraten deutlich weniger Nekrose – zu keinem Zeitpunkt überstieg der Anteil nekrotischer Zellen signifikant den Anteil nekrotischer Zellen in der Kontrollgruppe.

4.1.1.1.4 Dot-Plots

Dot-Plot-Grafiken zeigen den Übergang vitaler HT1080 Zellen in frühe Apoptose, nachfolgend Zelltod und Nekrose. In Abb. A4 sind exemplarisch Messungen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (2, 6, 12 und 24 Std.) für die Konzentration 50 ng/ml TRAIL dargestellt. Vitale Zellen werden dabei im linken unteren Quadranten der jeweiligen Einzelgrafik erfasst, apoptotische im rechten unteren, nekrotische im rechten oberen Quadranten. Nach 2 Std. wurden überwiegend vitale Zellen detektiert. Nach 6 und 12 Std. Inkubationszeit überwog bereits die Zahl apoptotischer Zellen und die Zahl nekrotischer Zellen nahm zu. Nach 24 Std. zeigt sich ein geringer Anteil vitaler Zellen, die übrigen Detektionen verteilen sich über den gesamten apoptotischen und nekrotischen Messbereich.

4.1.1.1.5 Fazit

HT1080 Fibrosarkomzellen sind TRAIL-empfindlich. TRAIL als Einzelsubstanz führte zum apoptotischen Zelltod in Abhängigkeit von Zeit und Dosis. Höhere Konzentrationen induzierten in signifikantem Maß frühe Apoptose und führten zu einer signifikanten Zunahme nekrotischer Zellen zu den nachfolgenden Zeitpunkten. TRAIL 50 ng/ml erreichte beinahe dieselbe Effizienz bezüglich Apoptose, führte jedoch zu niedrigeren Nekroseraten. Die niedrigste verwendete TRAIL-Konzentration (10 ng/ml) zeigte sich deutlich weniger effektiv in der Reduktion lebender Zellen als die übrigen drei Konzentrationen. Deshalb wählten wir TRAIL 50 ng/ml für die gemeinsame Behandlung mit TRD aus.

4.1.1.2 Apoptoseinduktion durch TRD als Einzelsubstanz

Um einen Apoptose induzierenden Effekt der Substanz Taurolidin nachzuweisen und gleichzeitig die wirksamste Konzentration sowie den Zeitpunkt der maximalen Apoptoseinduktion zu erfassen, wurden die Zellen dreimal hintereinander jeweils mit verschiedenen TRD-Konzentrationen (50, 100, 250 und 500 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert und in festgelegten Intervallen (2, 6, 12 und 24 Std.) gemessen. Tab. A15 zeigt die ermittelten Prozentanteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen (als Mittelwerte der drei konsekutiven Messungen).

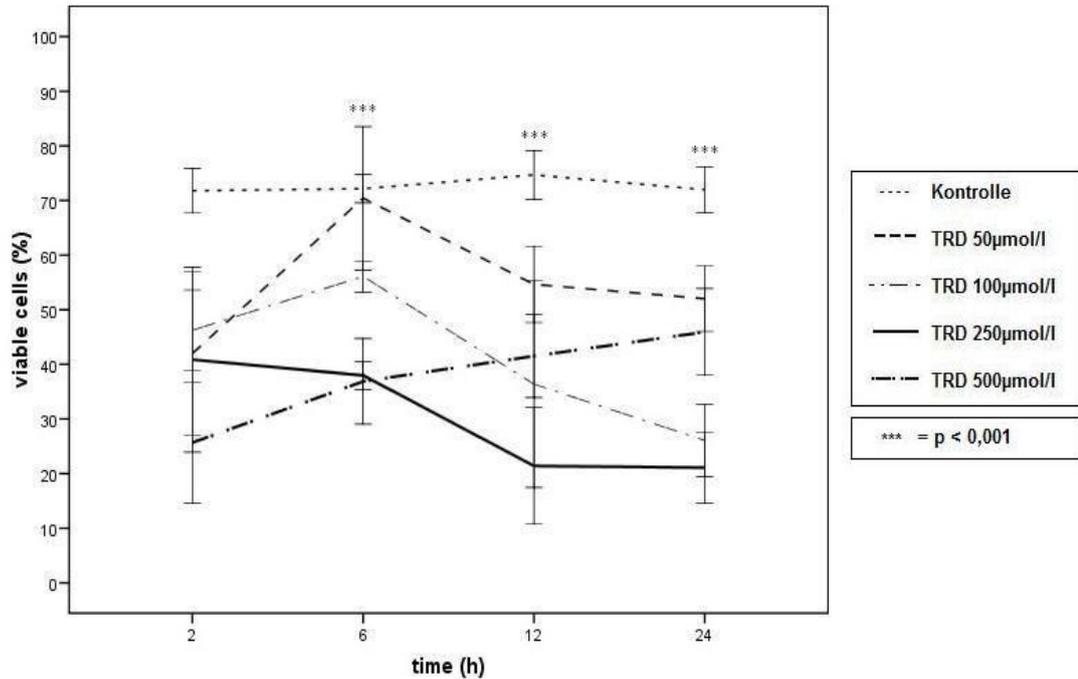


Abb. 8: Reduktion vitaler Zellen durch TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l)
 Signifikanzniveau angegeben für TRD 250 µmol/l vs. Kontrolle

4.1.1.2.1 Vitale Zellen

TRD als Einzelsubstanz reduziert signifikant die Zahl lebender HT1080 Zellen. Die stärkste Reduktion vitaler Zellen (21,09%) wurde nach 24 Std. bei einer Konzentration von 250 µmol/l beobachtet ($p < 0,001$).

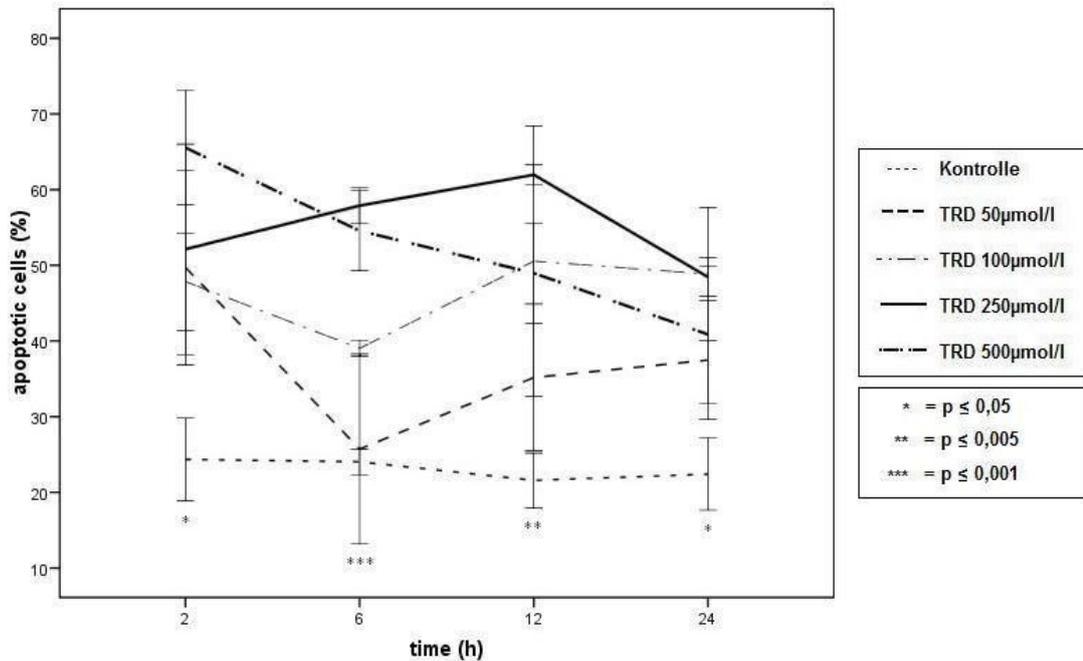


Abb. 9: Induktion von Apoptose durch TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l)

Signifikanzniveau angegeben für TRD 250 µmol/l vs. Kontrolle

4.1.1.2.2 Apoptose

TRD als Einzelsubstanz induziert in signifikantem Maß Apoptose in HT1080 Zellen. Die höchste Rate apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde nach 12 Std. bei einer Konzentration von 250 µmol/l beobachtet (62,0%) ($p < 0,005$). Die apoptoseinduzierenden Effekte von TRD 50 µmol/l waren nur moderat und erreichten zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Maß verglichen mit der Kontrolle. TRD 100 (50,55% nach 12 Std.) und TRD 500 µmol/l (48,96% nach 12 Std.) lösten ebenfalls Apoptose aus ($p < 0,05$), zeigten sich aber zu nahezu allen Zeitpunkten weniger effektiv als die Konzentration 250 µmol/l.

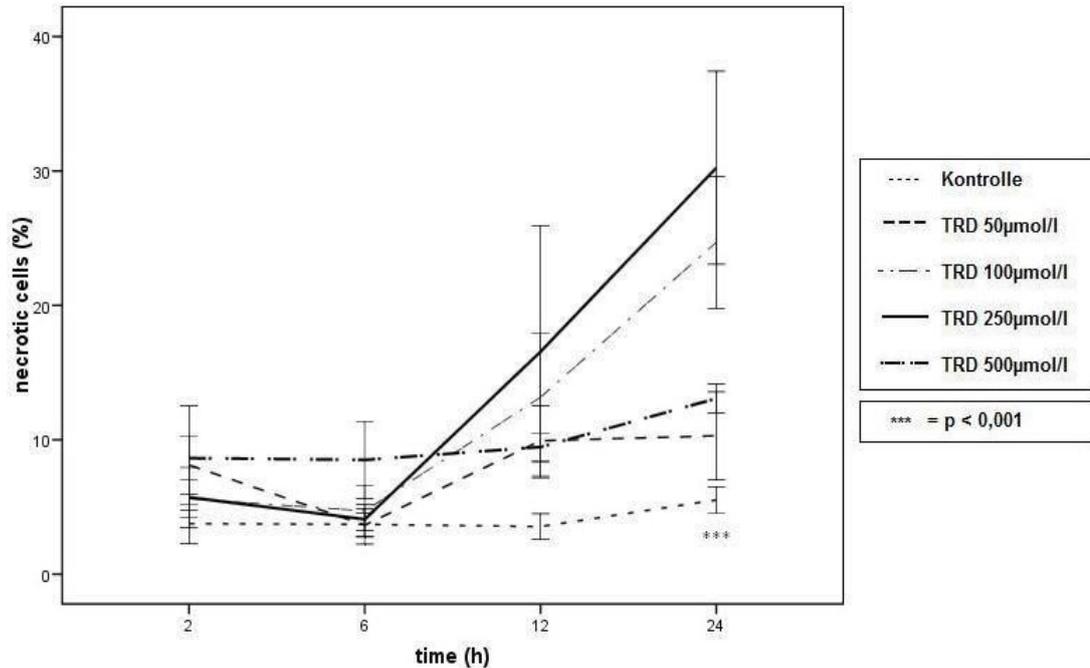


Abb. 10: Induktion von Nekrose durch TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l)
Signifikanzniveau angegeben für TRD 250 µmol/l vs. Kontrolle

4.1.1.2.3 Nekrose

Der Übergang von HT1080 Zellen in Nekrose wird durch TRD als Einzelsubstanz signifikant gefördert. Das Maximum (30,24%) wurde nach 24 Std. bei einer Konzentration von 250 µmol erreicht ($p < 0,001$). Von den übrigen Konzentrationen induzierten nur TRD 100 µmol/l nach 24 Std. ($p < 0,005$) und TRD 500 µmol/l nach 6 Std. ($p < 0,05$) in signifikantem Maß Nekrose.

4.1.1.2.4 Dot-Plots

In Abb. A5 sind exemplarisch Dot-Plots von Messungen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (2, 6, 12 und 24 Std.) für die Konzentration 250 µmol/l TRD dargestellt. Die Grafiken zeigen, dass nach 2 Std. Inkubationszeit überwiegend vitale Zellen detektiert wurden, nach 6 und 12 Std. die gemessene Zahl apoptotischer Zellen aber deutlich zunahm. Die letzte Messung nach 24 Std. zeigt einen sehr geringen Anteil vitaler Zellen und einen steigenden Anteil nekrotischer Zellen; der überwiegende Teil wurde im apoptotischen Messbereich registriert.

4.1.1.2.5 Fazit

TRD führt zum apoptotischen Zelltod menschlicher HT1080 Fibrosarkomzellen. Die apoptose- und nekroseinduzierende Wirkung erwies sich als zeit- und dosisabhängig. Die stärkste Apoptoseinduktion und Reduktion lebender Zellen wurde bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ als Einzelsubstanz beobachtet. Die apoptotischen und nekrotischen Effekte der übrigen Konzentrationen erwiesen sich zu allen Zeitpunkten als weniger effektiv als die 250 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration verglichen mit der Kontrolle. Daher wählten wir TRD 250 $\mu\text{mol/l}$, um es gemeinsam mit TRAIL zu applizieren.

4.1.1.3 Orientierender Versuch zur Substanz-Kombination

Zur Vorab-Evaluation eines möglichen synergistischen Effektes der Kombination der beiden Testsubstanzen TRAIL und TRD wurde die effektivste Konzentration TRD (250 $\mu\text{mol/l}$) in einem einfachen Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen TRAIL (1, 10, 50, 100 und 500 ng/ml) kombiniert und zu mehreren Zeitpunkten (6, 12 und 24 Std.) gemessen. Tab. A16 zeigt die ermittelten Prozentanteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen.

Die Kombination von TRD und TRAIL bewirkt die Reduktion vitaler Zellen und Induktion von Apoptose und Nekrose in HT1080 Zellen. Eine Abhängigkeit der Effekte von Konzentration und Inkubationszeit konnte gezeigt werden. Dabei gingen insbesondere hohe Konzentrationen TRAIL mit hohen Nekroseraten einher. Zugabe von TRAIL in einer Konzentration von 1 ng/ml hingegen führte erst nach 24 Std. zu einer Reduktion vitaler Zellen. Insgesamt bestätigte der Versuch die Auswahl der Konzentrationen (TRD 250 $\mu\text{mol/l}$ und TRAIL 50 ng/ml) für die folgenden Kombinations-Versuche.

4.1.1.4 Effekte der Kombination von TRD und TRAIL

Nach Ermittlung der Dosis TRD mit der stärksten apoptoseinduzierenden Wirkung (250 $\mu\text{mol/l}$) und der TRAIL-Dosis mit der niedrigsten Rate nekrotischer Zellen bei hoher apoptoseinduzierender Wirkung (50 ng/ml) wurden beide Substanzen in diesen Dosen kombiniert. Es erfolgten drei

Messungen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (2, 6, 12 und 24 Std.) an aufeinander folgenden Passagen mit den Testsubstanzen jeweils als Einzelsubstanz und in Kombination. Tab. A17 zeigt die ermittelten Prozentanteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen (als Mittelwerte der drei konsekutiven Messungen).

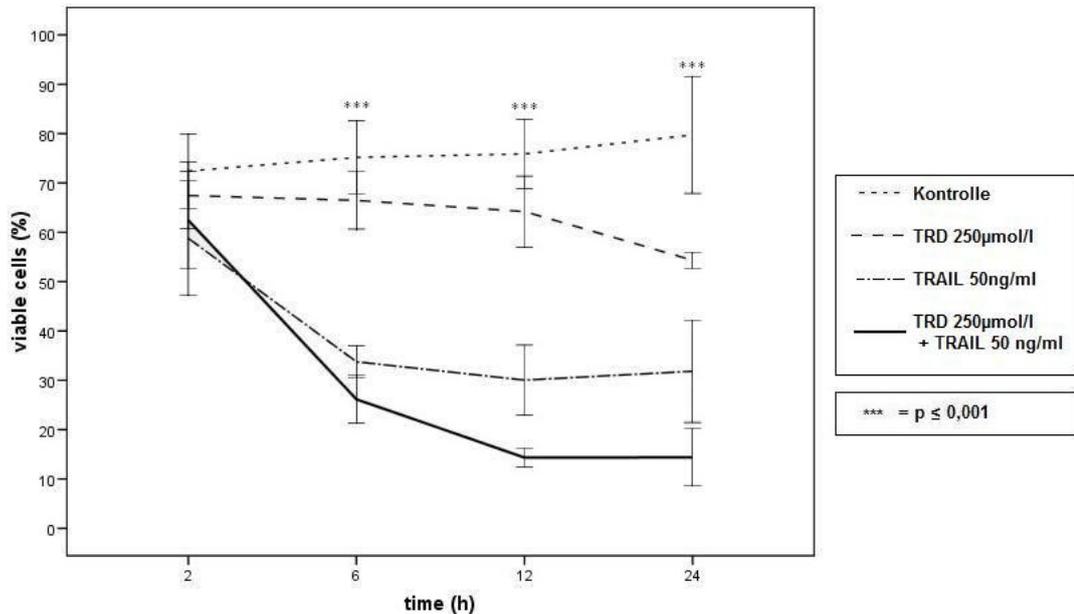


Abb. 11: Reduktion vitaler Zellen durch TRD und TRAIL (TRD 250 µmol/l, TRAIL 50 ng/ml und TRD 250 µmol/l + TRAIL 50 ng/ml)
Signifikanzniveau angegeben für die Kombinationsbehandlung vs. Kontrolle

4.1.1.4.1 Vitale Zellen

TRAIL 50 ng/ml als Einzelsubstanz erreichte über den gesamten Messzeitraum eine signifikante ($p = 0,001$) Reduktion der vitalen Zellzahl von 51,04% auf 25,09% (Faktor 2,0), TRD 250 µmol/l eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion von 66,47% auf 43,26% (Faktor 1,5). Die Kombination konnte die Zahl vitaler Zellen signifikant ($p < 0,001$) um den Faktor 4,0 reduzieren (von 58,35% auf 14,38%). Demnach konnte der durch die Einzelsubstanzen hervorgerufene Effekt durch Kombination mindestens verdoppelt und ein Synergismus nachgewiesen werden.

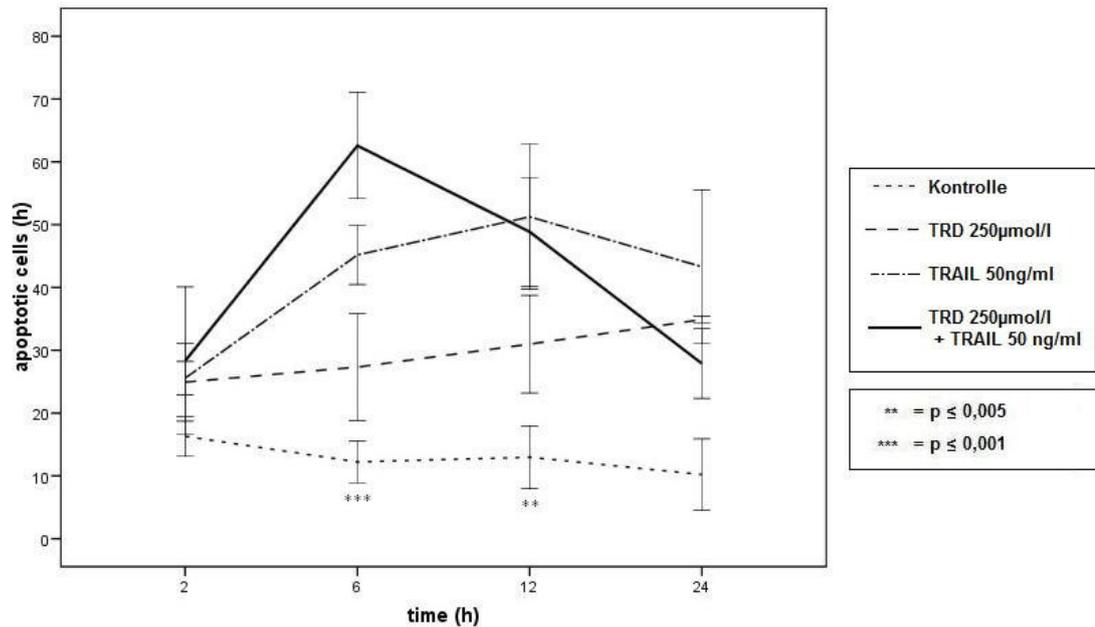


Abb. 12: Induktion von Apoptose durch TRD und TRAIL

(TRD 250 µmol/l, TRAIL 50 ng/ml und TRD 250 µmol/l + TRAIL 50 ng/ml)

Signifikanzniveau angegeben für die Kombinationsbehandlung vs. Kontrolle

4.1.1.4.2 Apoptose

Der Anteil apoptotischer Zellen nahm nach Inkubation mit TRD signifikant ($p < 0,05$) um den Faktor 1,7 (von 27,26% auf 45,93% nach 24 Std.), nach Inkubation mit TRAIL signifikant ($p < 0,005$) um den Faktor 1,8 (von 27,8% auf 51,25% nach 12 Std.) und durch die Kombination signifikant ($p < 0,001$) um den Faktor 1,8 (von 32,94% auf 59,24% nach 6 Std.) zu. Die apoptoseinduzierende Wirksamkeit unterschied sich demnach vor allem durch die notwendige Inkubationszeit, so bewirkte die Kombination deutlich früher einen signifikanten Anstieg der Apoptoseraten als die Einzelsubstanzen.

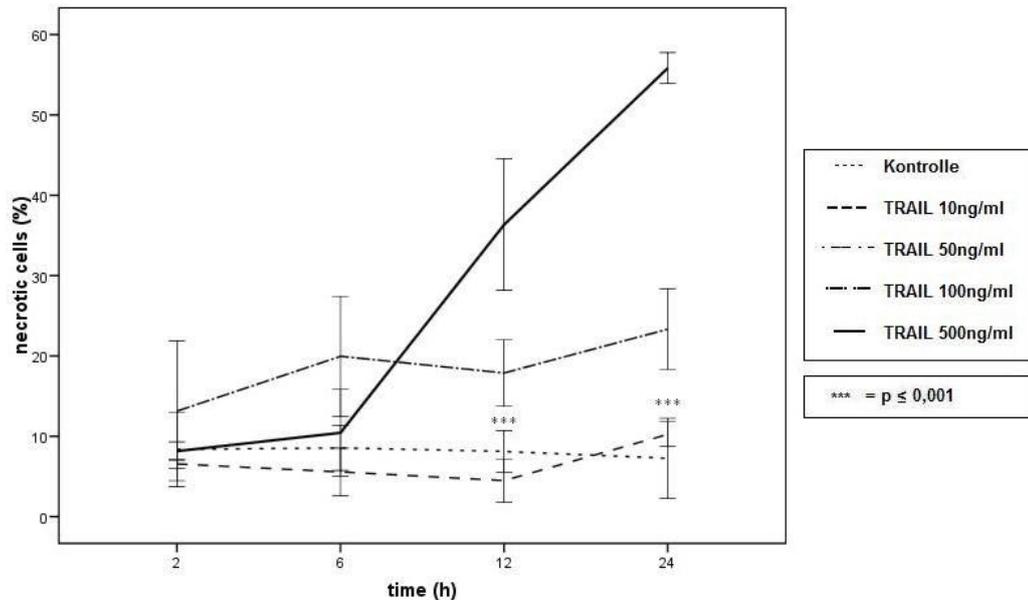


Abb. 13: Induktion von Nekrose durch TRD und TRAIL
(TRD 250 $\mu\text{mol/l}$, TRAIL50 ng/ml und TRD 250 $\mu\text{mol/l}$ +TRAIL50 ng/ml)
Signifikanzniveau angegeben für die Kombinationsbehandlung vs. Kontrolle

4.1.1.4.3 Nekrose

Über den gesamten Messzeitraum stieg der Anteil nekrotischer Zellen nach Inkubation mit TRD von 7,35% auf 10,34% (Faktor 1,4), nach Inkubation mit TRAIL signifikant ($p > 0,005$) von 13,12% auf 23,33% (Faktor 1,8) und durch Kombinationsbehandlung signifikant ($p < 0,001$) von 7,61% auf 55,82% (Faktor 7,3). Der durch TRAIL als Einzelsubstanz hervorgerufene Effekt konnte demnach vervierfacht, der durch TRD als Einzelsubstanz hervorgerufene verfünffacht und ein Synergismus nachgewiesen werden.

4.1.1.4.4 Dot-Plots

Abb. A6 zeigt Dot-Plot-Grafiken für die Kombinationsbehandlung mit 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD plus 50 ng/ml TRAIL. Ein Übergang vitaler Zellen in apoptotische konnte bei Kombinationsbehandlung bereits nach 2 Std. Inkubationszeit gemessen werden. Nach 6 Std. lagen überwiegend apoptotische Zellen vor. Nach 12 Std. nahm der Anteil nekrotischer Zellen deutlich zu, und nach 24 Std. wurden überwiegend nekrotische Zellen detektiert.

4.1.2 TUNEL-Assay

Mit der TUNEL-Methode erfolgte qualitativ der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von DNA-Strangbrüchen im Rahmen apoptotischer Vorgänge in HT1080 Zellen nach 2 und 4-stündiger Inkubation mit TRD und/oder TRAIL.

Abb. 14 zeigt exemplarisch Zellen in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung nach 4-stündiger Behandlung mit 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD, 50 ng/ml TRAIL, beidem in Kombination sowie einer Kontrolle mit Povidon/ H_2O , gefärbt nach der TUNEL-Methode. In Abb. 15 sind die dazugehörige Negativ- und Positivkontrolle dargestellt.

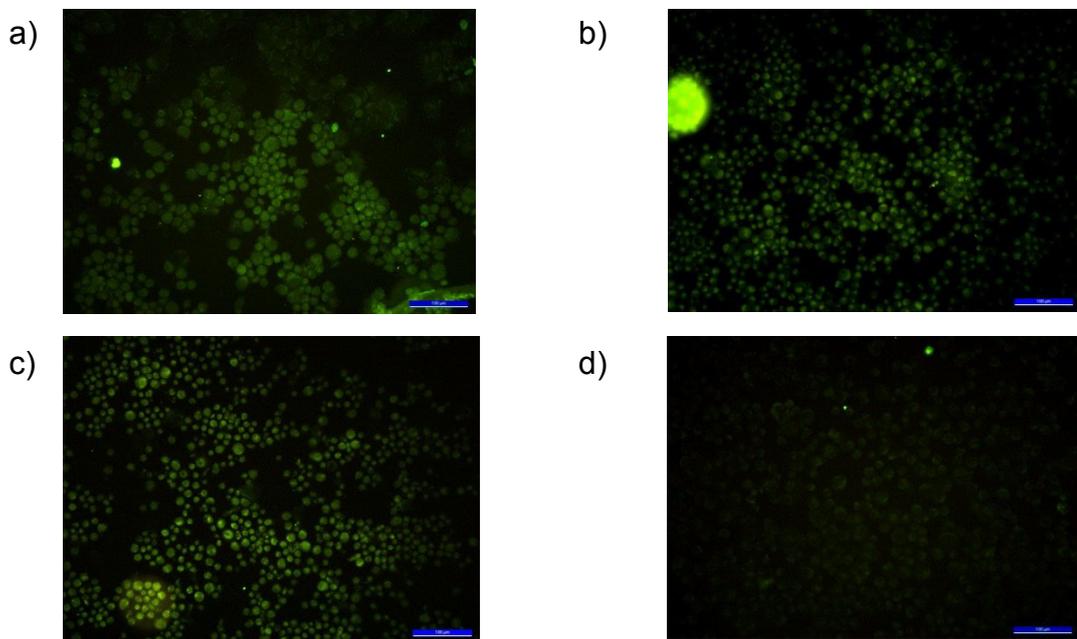


Abb. 14: TUNEL-Assay, Proben

nach 4-stündiger Inkubation mit 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD (a), 50 ng/ml TRAIL (b), 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD + 50 ng/ml TRAIL (c) und Povidon/ H_2O (d)

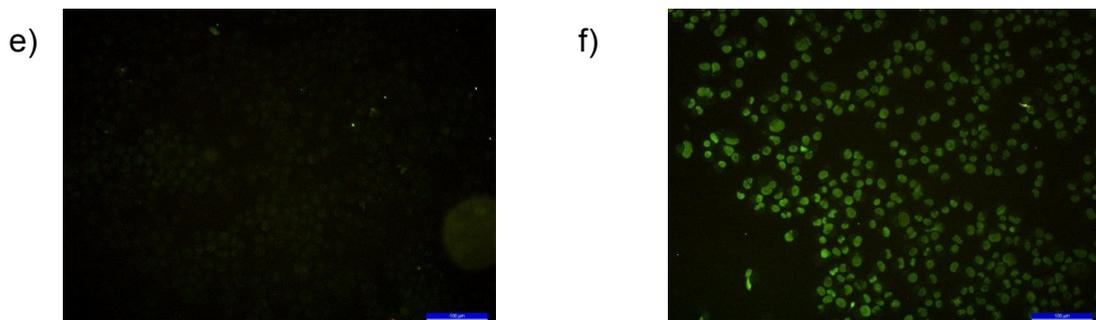


Abb. 15: TUNEL-Assay, Kontrollen

Negativkontrolle (e), Positivkontrolle (f)

Inkubation mit 250 µmol/l TRD bzw. 50 ng/ml TRAIL führt zu DNA-Strangbrüchen im Rahmen apoptotischer und nekrotischer Vorgänge – deutliche Fluoreszenz ist detektierbar. Die Kombinationsbehandlung mit TRD und TRAIL in oben genannten Konzentrationen bewirkt ebenfalls zahlreiche apoptotischen Vorgängen und im Zuge dessen DNA-Strangbrüchen – starke Fluoreszenz ist detektierbar. In der Kontrollgruppe kommt es nicht in relevantem Maß zu DNA-Strangbrüchen, dementsprechend ist kaum Fluoreszenz detektierbar. In der Negativkontrolle unterbleibt durch das Fehlen der terminalen Transferase der Einbau von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden – es ist kein Signal detektierbar. In der Positivkontrolle hingegen führt der Einsatz von DNase I enzymatisch katalysiert zu zahlreichen DNA-Strangbrüchen, es resultiert maximale Fluoreszenz.

4.2 Beurteilung der Zellmorphologie

Für die Versuche wurden die Fibrosarkomzellen wie für die Durchflusszytometrie mit den Wirk- und Kontrollsubstanzen inkubiert. Die Evaluation morphologischer Veränderungen und des Adhäsionsverhaltens wurde lichtmikroskopisch photodokumentiert, apoptose- und nekroseinduzierende Effekte unter Färbung mit Annexin/FITC und PI fluoreszenzmikroskopisch visualisiert.

4.2.1 Lichtmikroskopie

4.2.1.1 Zellwachstum

Abb. A7 zeigt in 20facher Vergrößerung das Wachstum einer unbehandelten Zellprobe über einen Zeitraum von 60 Std. – entsprechend dem zeitlichen Verlauf einer nach 36 Std. nativem Wachstum mit den Wirkstoffen inkubierten Zellprobe bis zum Inkubationszeitpunkt 24 Std.

4.2.1.2 Einfluss von TRD und TRAIL auf die Zellmorphologie

TRD als Einzelsubstanz und die Kombination von TRD und TRAIL zeigten lichtmikroskopisch sichtbare Effekte auf die Zellmorphologie und das Adhäsionsverhalten von HT1080 Zellen. Abb. 16 zeigt die lichtmikros-

kopische Darstellung (Vergrößerung 20fach) von Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit, 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD, 50 ng/ml TRAIL, 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD + 50 ng/ml TRAIL und als Kontrolle 250 $\mu\text{mol/l}$ Povidon/ H_2O .

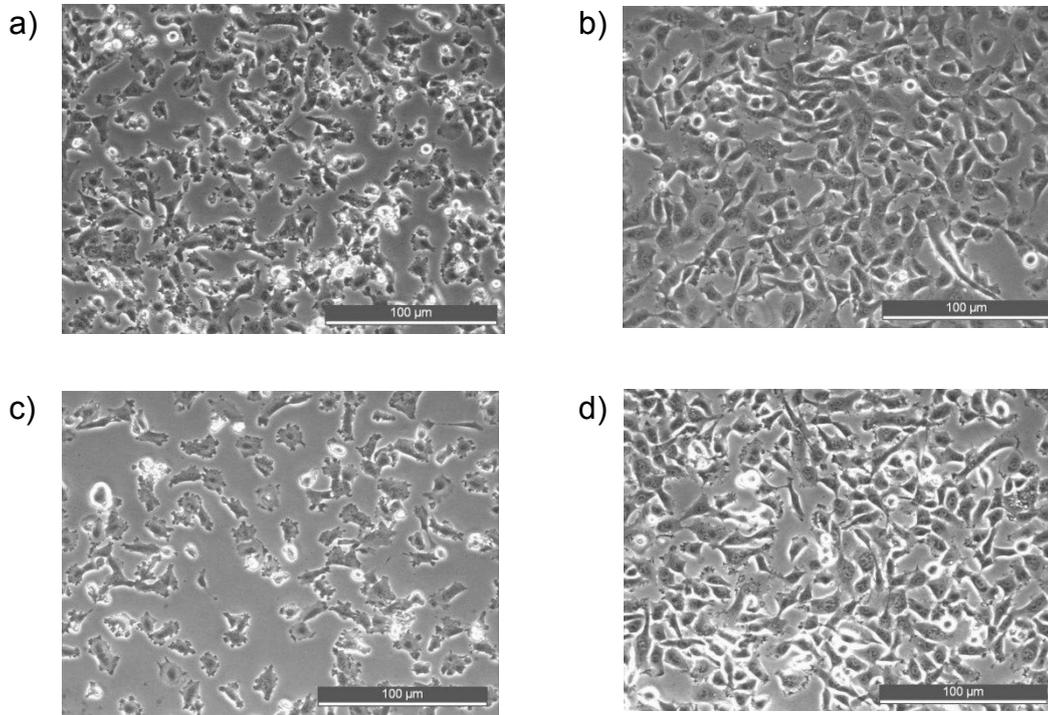


Abb. 16: Lichtmikroskopie

nach 2-stündiger Inkubation mit 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD (a), 50 ng/ml TRAIL (b), 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD + 50 ng/ml TRAIL (c), 250 $\mu\text{mol/l}$ Povidon + H_2O (Kontrolle) (d)

Im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen Povidon und H_2O (d) konnte für TRAIL (b) kein Unterschied im Hinblick auf eine veränderte Zellmorphologie festgestellt werden. Auch nach entsprechender Inkubationszeit wurde ein intakter, subkonfluent wachsender Zellrasen vorgefunden. Auf Inkubation mit 250 $\mu\text{mol/l}$ TRD (a) reagierten die Zellen mit einer Veränderung ihrer Morphologie: Zellschrumpfung und Veränderung der Zelloberfläche mit Abschnürung von Vesikeln, Desintegration der Zellgruppen und vermehrtes Ablösung vom Flacon-Boden. Die Zugabe von 50 ng/ml TRAIL (c) verstärkte dieses Phänomen nochmals sichtbar.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Der apoptosefördernde Effekt von TRD, TRAIL und ihrer Kombination auf die Morphologie von HT1080 Zellen konnte nach Färbung mit Annexin/FITC und PI fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden.

Im Anhang zeigt Abb. A8 exemplarisch eine vitale Zelle im Durchlicht- und Fluoreszenzmodus: Es wurde kein Farbstoff aufgenommen. Abb. A9 zeigt apoptotische und nekrotische Zellen mit erhaltener Zellstruktur: Das grün fluoreszierende Annexin/FITC, welches sich an Phosphatidylserinmoleküle in der Zellmembran anlagert, markiert dabei die Zellmembran und sich abschnürende Vesikel (apoptotic bodies). Das rot fluoreszierende PI bindet an dsDNA und hebt den Zellkern hervor. Daneben sind zum Teil Umrisse ungefärbter, vitaler Zellen erkennbar.

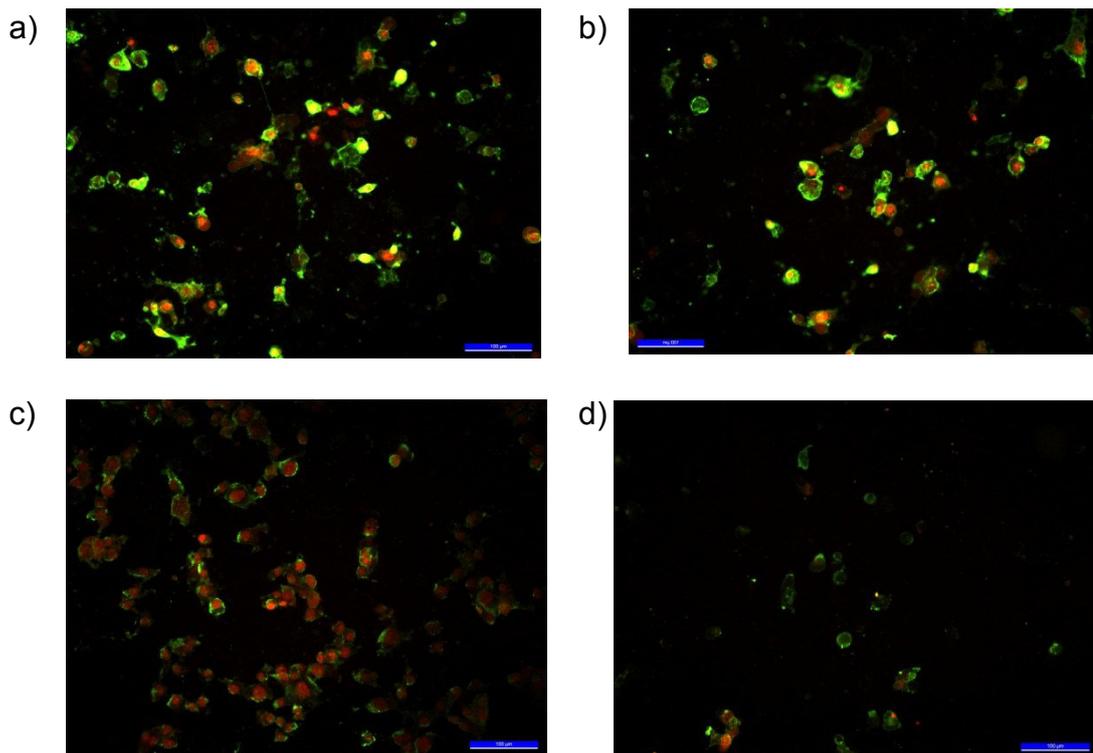


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopie

nach 4-stündiger Inkubation mit 250 µmol/l TRD (a), 50 ng/ml TRAIL (b), 250 µmol/l TRD + 50 ng/ml TRAIL (c), 250 µmol/l Povidon + H₂O (Kontrolle) (d)

Oben stehende Abb. 17 zeigt exemplarisch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 250 µmol/l TRD, 50

ng/ml TRAIL, 250 µmol/l TRD + 50 ng/ml TRAIL sowie 250 µmol/l Povidon/H₂O als Kontrolle. Während die Kontroll-Zellen (d) nahezu keinen Farbstoff aufnehmen, zeigt sich nach Inkubation mit TRD (a) eine Anzahl markierter Zellen, v.a. Annexin/FITC-positive. TRAIL (b) bewirkt ebenfalls eine vermehrte Aufnahme von Annexin/FITC im Rahmen apoptotischer und nekrotischer (zusätzlich PI-positiv) Vorgänge. Die Kombination von TRD und TRAIL (c) führt zu einer hohen Zahl überwiegend nekrotischer Zellen (Annexin/FITC- und PI-positiv).

4.3 Einfluss von TRD und TRAIL auf die Proliferation

Für die Versuche wurden die Fibrosarkomzellen mit TRD, TRAIL und der Kombination sowie den Kontrollsubstanzen für 8 Std. auf 96-well Platten inkubiert. Durch Zugabe des Thymidin-Analogons BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), welches in neu synthetisierte DNA eingebaut und über eine Antikörper-gekoppelte Substratreaktion detektiert wird, ist die Quantifizierung der Proliferationsrate möglich.

4.3.1 Zellproliferations-BrdU-ELISA

TRD und TRAIL als Einzelsubstanzen sowie in Kombination hemmten die Proliferation von HT1080 Zellen signifikant verglichen mit der Kontrolle ($p < 0,001$).

Die nachfolgende Abb. 18 zeigt die antiproliferative Wirkung von TRD, TRAIL und der Kombinationsbehandlung nach einer Inkubationszeit von 8 Std. verglichen mit der Kontrollgruppe:

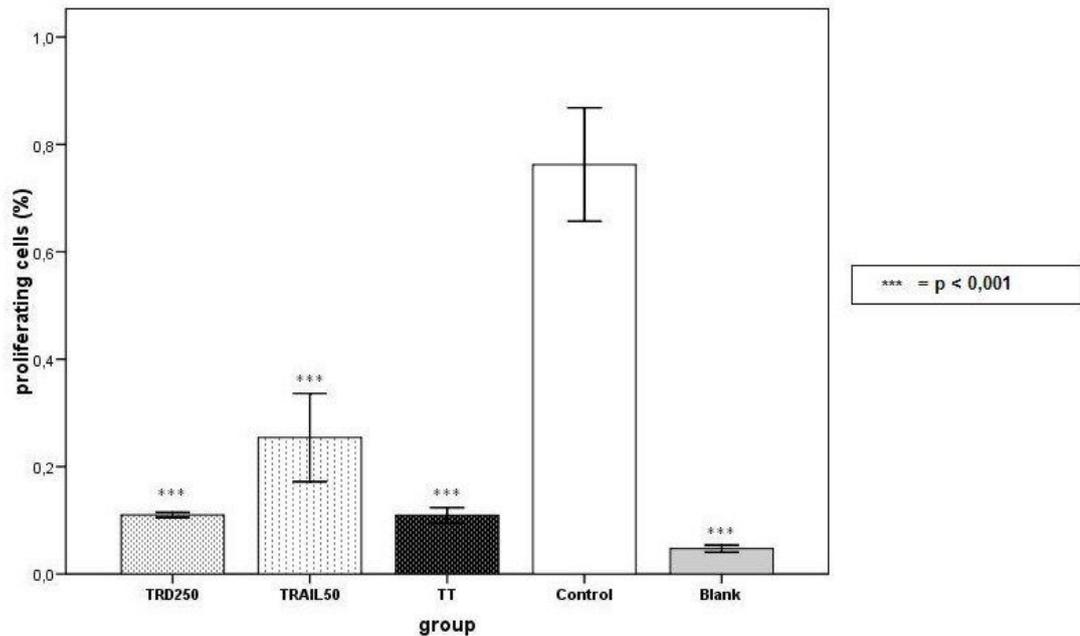


Abb. 18: BrdU-Proliferationsassay

nach 8-stündiger Inkubation mit TRD 250 $\mu\text{mol/l}$, TRAIL 50 ng/ml, TRD 250 $\mu\text{mol/l}$ + TRAIL 50 ng/ml, Povidon 250 $\mu\text{mol/l}$ + H_2O (Kontrolle)

Die antiproliferative Wirksamkeit von TRD war signifikant höher als die von TRAIL ($p < 0,001$). Auch die Kombinationsbehandlung hemmte die Proliferation signifikant ($p < 0,001$), dabei war der Effekt durch die Kombinationsbehandlung nicht signifikant größer als bei Behandlung mit TRD allein ($p = 1,0$), jedoch signifikant größer als bei Behandlung mit TRAIL allein ($p < 0,001$). Die Rohwerte der Messungen finden sich in Tab. A18.

4.3.1.1 Fazit

TRD und TRAIL als Einzelsubstanz hemmen die Proliferation von HT1080 Fibrosarkomzellen in vitro. TRD ist effektiver als TRAIL, die Kombination beider Substanzen steigert die Wirksamkeit nicht.

4.4 Effekte durch TRD und TRAIL auf Ebene der Genexpression

Für die Versuche wurden HT1080-Zellen für 2 Std. mit den Wirk- und Kontrollsubstanzen inkubiert, anschließend deren RNA isoliert, diese in

biotinylierte antisense-cRNA umgeschrieben und farbmarkiert. Es folgten die Expressionsanalyse ausgewählter Gene mit Relevanz für apoptotische Vorgänge mittels Gene Chip Microarray (Affymetrix) und deren statistische Auswertung. Funde für einzelne Schlüsselgene wurden anschließend in der Real-time-PCR nochmals validiert.

4.4.1 Oligonukleotid-Microarray

Die Untersuchung der mRNA-Expression mittels Oligonukleotid-Microarray zeigte, dass TRD und TRAIL nach einer Inkubationszeit von 2 Std. Veränderungen in der Expression einer Reihe von Genen in HT1080 Zellen verursachen.

4.4.1.1 Allgemein

Wir konzentrierten uns bei diesen Versuchen auf 621 Probesets mit Bezug zur apoptotischen Signaltransduktion. Davon konnten nach Filterung (ca+filter1) für 174 Probesets – repräsentativ für 138 apoptosebezogene Gene – Expressionsveränderungen verlässlich gemessen werden (ca+filter1 Target). Ein SLR = 1 bedeutet hierbei zweifache Überexpression relativ zur Vergleichsgruppe, ein SLR = -1 halbe Expression wie in der Vergleichsgruppe. TRD als Einzelsubstanz beeinflusste die Expression von 67 dieser Gene, davon zeigten sich 22 hochreguliert. Im Vergleich dazu induzierte TRAIL als Einzelsubstanz Expressionsveränderungen in 36 der apoptosebezogenen Gene, davon 22 hochreguliert. TRD und TRAIL in Kombination verursachten Veränderungen in der Expression von 65 Genen (29 hochreguliert, 28 herunterreguliert). Eine Auflistung dieser Gene und ihrer Expressionsveränderungen findet sich in Tab. A19 und A20.

4.4.1.2 Heat Map

Eine grafische Veranschaulichung der Ergebnisse des HG-U133A_2.0 Microarray-Chips, dargestellt als SLR, findet sich in Abb. A10(a) (vgl. auch Abb. 19).

4.4.1.3 Clustering

Die Datensätze wurden durch hierarchisches Clustering geordnet, vgl. hierzu Abb. A10(b).

4.4.1.4 Auswahl differentiell regulierter Gene für Validierung

Weiteres Eingrenzen der Ergebnisse auf solche Gene, deren Expressionsveränderungen einen SLR > 1 oder <-1 aufwiesen, verringerte die Anzahl differentiell regulierter Gene in dieser Versuchsreihe auf 21 (25 Probesets).

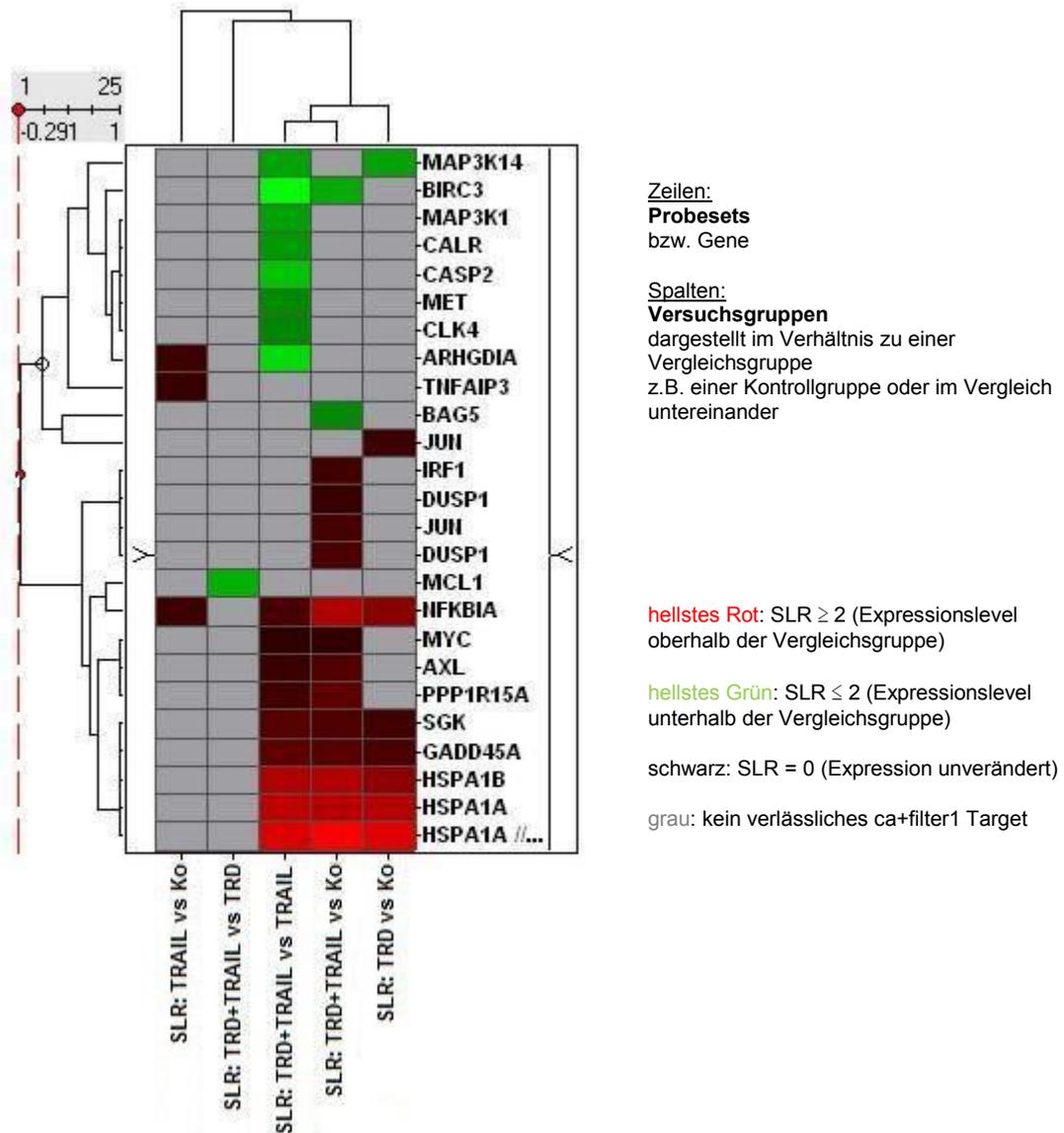


Abb. 19: Microarray

Ergebnisse als Heat Map für 25 ausgewählte Gene nach 2-stündiger Inkubation mit TRD 250 µmol/l, TRAIL 50 ng/ml, TRD 250 µmol/l + TRAIL 50 ng/ml und 250 µmol/l Povidon/H₂O als Kontrolle (Ko)

Das Dendrogramm oberhalb der Matrix in Abb. 19 weist den Grad der Ähnlichkeit zwischen den Versuchsgruppen aus, dasjenige auf der linken Seite den Ähnlichkeitsgrad der ausgewählten Gene zueinander entsprechend ihrer Expressionsmuster.

Unten stehende Tab. 18 zeigt eine Auswahl der differentiell regulierten Gene und spezifiziert die durch die Wirksubstanzen im Verhältnis zur Kontrolle hervorgerufenen Effekte.

Tab. 18: Microarray, Veränderung der Genexpression (SLR)

nach 2-stündiger Inkubation mit TRD 250 µmol/l, TRAIL 50 ng/ml, TRD 250 µmol/l + TRAIL 50 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle (Ko)

Hochregulation (↑), Herunterregulation (↓)

TRD vs. Ko	SLR	TRAIL vs. Ko	SLR	TRD + TRAIL vs. Ko	SLR	
HSPA1A	///					↑
HSPA1B	2,99			HSPA1A /// HSPA1B	3,28	
HSPA1A	2,49			HSPA1A	2,54	
HSPA1B	2,06			HSPA1B	2,45	
NFKBIA	2,03	NFKBIA	1,17	NFKBIA	2,47	
				PPP1R15A	1,55	
GADD45A	1,33			GADD45A	1,46	
				AXL	1,41	
SGK	1,22			SGK	1,37	
				DUSP1	1,33	
JUN	1,2			JUN	1,31	
				IRF1	1,23	
				DUSP1	1,12	
				MYC	1,05	
		ARHGDI1	1,19			
		TNFAIP3	1,11			
MAP3K14	-1,35					↓
				BAG5	-1,08	
				BIRC3	-1,45	

Expressionsveränderungen in der ausgewählten Größenordnung ergaben sich darüber hinaus für weitere Gene im Vergleich von mit TRD+TRAIL

behandelten Zellen zu mit TRD (1 Gen herunterreguliert) bzw. TRAIL (9 Gene hoch-, 8 herunterreguliert) als Einzelsubstanz behandelten (vgl. Tab. A20) – so z.B. für MAP3K1.

4.4.2 Real-time PCR

Die Expression ausgewählter Gene (ARGHGDIA, BIRC3, GADD34, HSPA1A, HSPA1B, MAP3K14, MAP3K1, NFKBIA) nach Inkubation mit den Wirksubstanzen wurde mittels rtPCR erneut beurteilt. Dies geschah für eine Auswahl von Genen, für die Western-Blot-fähige Antikörper zur Verfügung standen und deren Expression im Microarray (MA) mindestens zweifach gegenüber der Kontrolle abgewichen war. Die Inkubationszeit mit den Wirksubstanzen betrug für diesen Versuch 2 Std. (Tab. A21 und A22).

4.4.2.1 Ergebnisse für ausgewählte Gene

NFKBIA/I κ B- α

Die Expression von NFKBIA (nuclear factor of kappa light-polypeptide gene-enhancer in B-cells inhibitor, alpha), synonym I κ B- α , korrelierte in hohem Maße mit den Ergebnissen des MA im Sinne einer mehr als zweifachen Hochregulation.

HSPA1A/B

Für HSPA1A und HSPA1B (heat shock 70kDa protein 1A/B) ergab sich gleichfalls eine gute Korrelation zwischen rtPCR und MA im Sinne einer Hochregulation der Expression – vor allem durch TRD+TRAIL.

GADD45A

Sowohl laut MA als auch laut PCR bewirkte die Kombinationsbehandlung eine mehr als zweifache Hochregulation von GADD45A (growth arrest and DNA damage inducible, alpha), die sich in der PCR deutlich ausgeprägter darstellte. TRD erreichte eine vergleichbare Hochregulation mit guter Korrelation von MA und PCR, TRAIL eine vergleichsweise geringere Hochregulation.

GADD34/PPP1R15A

Die Expression von GADD34, synonym PPP1R15A (protein phosphatase1 regulatory (inhibitor) subunit 15A), zeigte eine gute Korrelation zu den Ergebnissen im MA im Sinne einer Hochregulation in geringfügig abweichender Ausprägung.

BIRC3/c-IAP-2

Die Ergebnisse für BIRC3 (baculoviral IAP repeat containing 3), synonym c-IAP-2, korrelierten gut mit denen des MA: Im Vergleich zur Kontrolle verringerte die Kombinationsbehandlung TRD+TRAIL die Expression deutlich. TRAIL als Einzelsubstanz steigert sie hingegen.

MAP3K1

Die rtPCR-Ergebnisse für MAP3K1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1) deckten, wie im MA, die Tendenz zur Herunterregulation durch TRD und TRD+TRAIL auf, jedoch in davon abweichendem Ausmaß.

MAP3K14/NIK

MAP3K14 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14), synonym NIK, zeigte sich wie im MA herunterreguliert, vor allem durch TRD+TRAIL, allerdings in insgesamt geringerem Ausmaß.

ARHGDI1/Rho GDI α

Für ARHGDI1, synonym Rho GDI α (Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha), ergab die rtPCR den Funden im Microarray (MA) entgegengesetzte Ergebnisse für die Einzelsubstanzen. Dabei erreichte lediglich TRAIL einen SLR >1. Die Kombinationsbehandlung zeigte hingegen eine Korrelation in der Tendenz zur Herunterregulation.

4.4.2.2 Fazit

Insgesamt ergab sich eine größtenteils gute Korrelation der Ergebnisse von MA und rtPCR.

4.5 Effekte durch TRD und TRAIL auf Ebene der Proteinexpression

Um zu beurteilen, inwieweit sich die Genexpressionsveränderungen auf Ebene der Translation fortsetzen, wurden die Produkte der im MA ausgewählten und in der rtPCR überprüften Gene im Western Blot (WB) untersucht. Hierfür wurden Zellen für 2 und 4 Std. mit den Wirksubstanzen inkubiert.

4.5.1 Western Blot

TRD und TRAIL verändern die Translation apoptoseassoziiierter Proteine in HT1080 Zellen.

4.5.1.1 Ergebnisse für ausgewählte Gene/Proteine

Unten stehende Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse des Western Blot für ausgewählte Gene/Proteine (Abb. 20-25).

NFKBIA/I κ B- α

Die sowohl in MA als auch in der rtPCR gefundene, ausgeprägte Hochregulation von NFKBIA durch TRD, TRAIL und ihre Kombination – dabei stärker durch TRD bzw. TRD+TRAIL als durch TRAIL allein – stellte sich auch im WB dar.

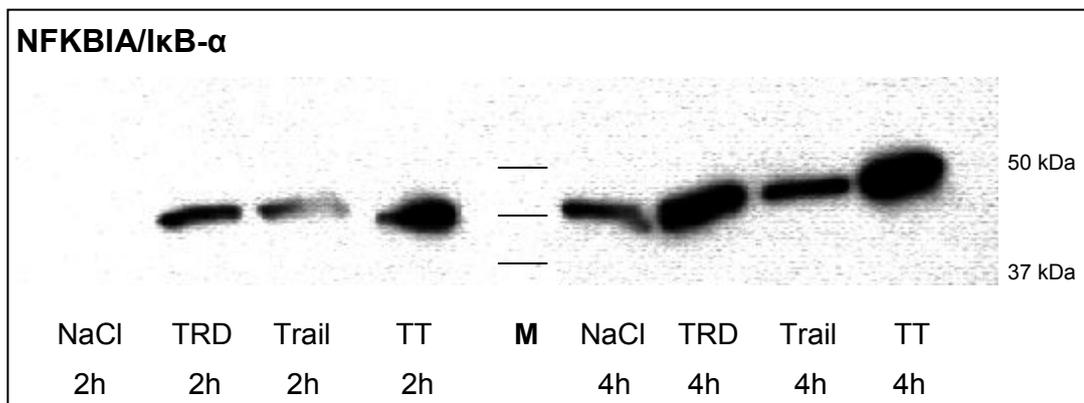


Abb. 20: Western Blot, NFKBIA/I κ B- α

M = Marker

GADD45A

GADD45A zeigte sich im MA mehr als zweifach hochreguliert durch TRD und TRD+TRAIL im Vergleich zur Kontrolle und zu TRAIL als Einzelsubstanz. In der rtPCR stellte sich dies noch ausgeprägter dar, im WB fand sich die Tendenz wieder.

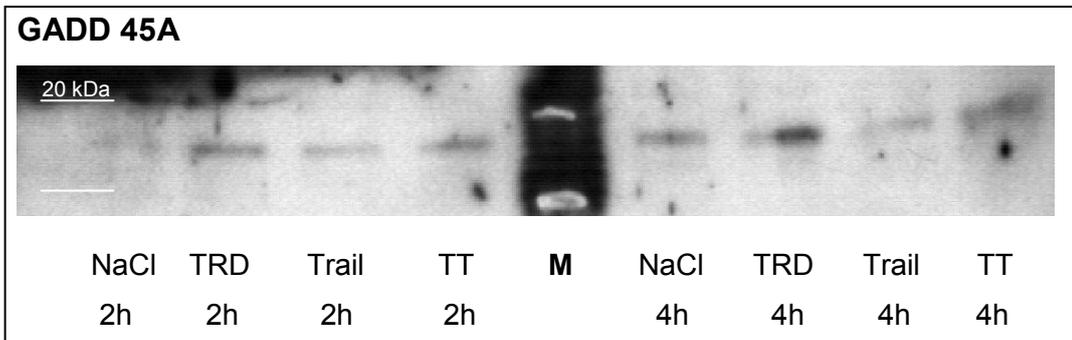


Abb. 21: Western Blot, GADD45A

M = Marker

GADD34/ PPP1R15A

Sowohl im MA als auch in der PCR zeigte sich GADD34 mehr als zweifach hochreguliert durch TRD+TRAIL im Vergleich zur Kontrolle und zu TRAIL allein, und ebenfalls deutlich hochreguliert durch TRD allein im Vergleich zur Kontrolle. Der Western Blot (WB) ergab ein vergleichbares Bild nach 2 und ausgeprägter nach 4 Std.

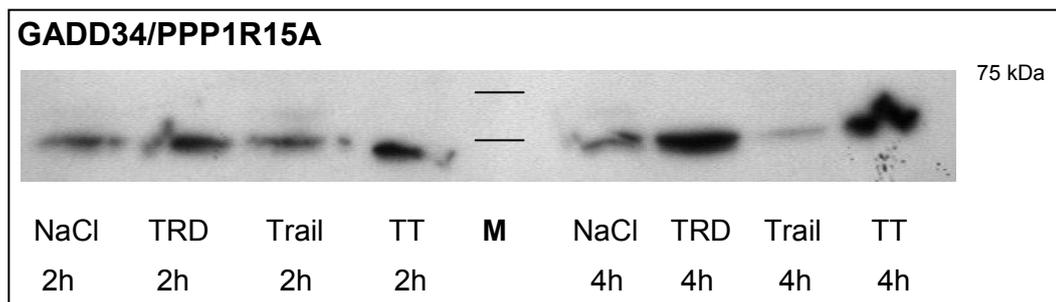


Abb. 22: Western Blot, GADD34/ PPP1R15A

M = Marker

BIRC3/c-IAP-2

MA und rtPCR ergaben für BIRC3 bei Behandlung mit TRD+TRAIL im Vergleich zur Kontrolle und zu TRAIL allein eine mehr als zweifache

Herunterregulation, im WB zeigte sich dies nicht eindeutig. Die Hochregulation durch TRAIL allein im Vergleich zur Kontrolle fand sich hingegen im WB wieder. Für TRD allein hatte nur die rtPCR eine Herunterregulation gezeigt, im WB fand sich diese nach 4 Std. zumindest in der Tendenz wieder.

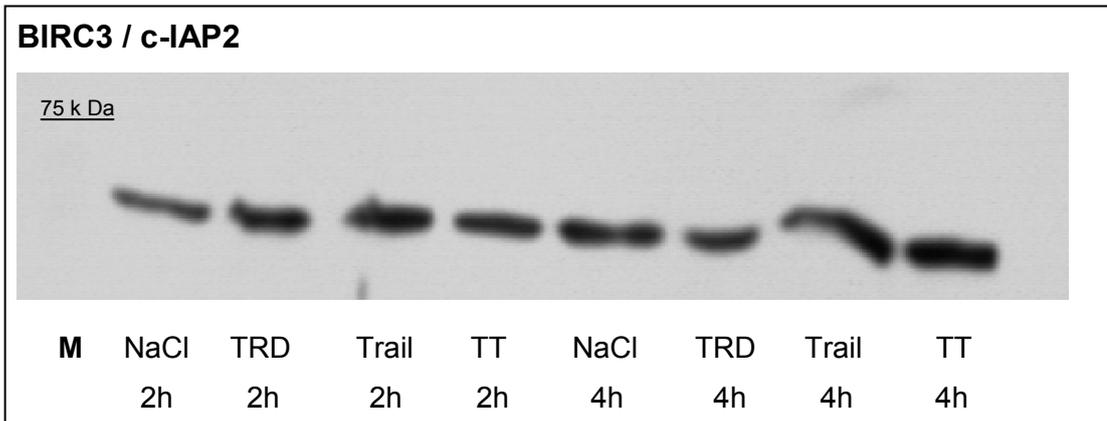


Abb. 23: Western Blot, BIRC3/c-IAP-2

M = Marker

MAP3K14/ NIK

Für MAP3K14 zeigte sich im WB eine in rtPCR und MA nicht gesehene Herunterregulation durch TRAIL als Einzelsubstanz nach 2 und 4 Std. Die deutliche Herunterregulation durch TRD allein in MA und rtPCR fand sich hingegen nicht wieder. Die festgestellte Herunterregulation durch die Kombination TRD+TRAIL ergab sich jedoch auch im WB nach 4 Std.

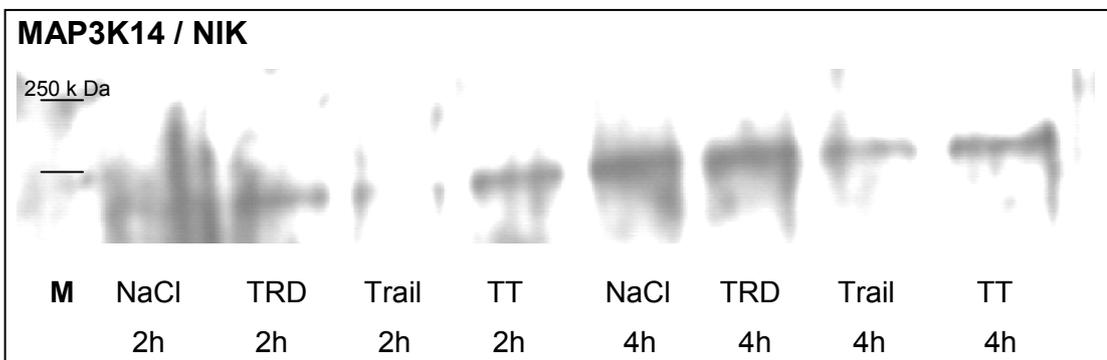


Abb. 24: Western Blot, MAP3K14/ NIK

M = Marker

4.6.1 Ergebnisse für ausgewählte Untereinheiten

TRAIL zeigte keinen Effekt auf p50, während sich die Aktivität durch TRD leicht und nach Kombinationsbehandlung etwas deutlicher gesteigert zeigte. Noch ausgeprägter ließ sich dies für p65/RelA beobachten, dessen Aktivität durch TRAIL etwas, durch TRD deutlich und am stärksten durch die Kombination gesteigert wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich p52 durch TRAIL leicht supprimiert, durch TRD und die Kombination noch deutlicher. Das Gleiche gilt für RelB, dessen Aktivität TRAIL, deutlicher noch TRD und die Kombination, verringerten. Die Ergebnisse für c-Rel fielen insofern aus diesem Schema heraus, als dass sich für TRD kein Effekt zeigte, TRAIL die Aktivität der Untereinheit verminderte und die Kombination sie dem entgegen verstärkte.

Abb. 26 zeigt exemplarisch die Ergebnisse des ELISA für Rel-B und p65/RelA einschließlich Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen, alle weiteren Daten zeigen Tab. A23 und Abb. A11.

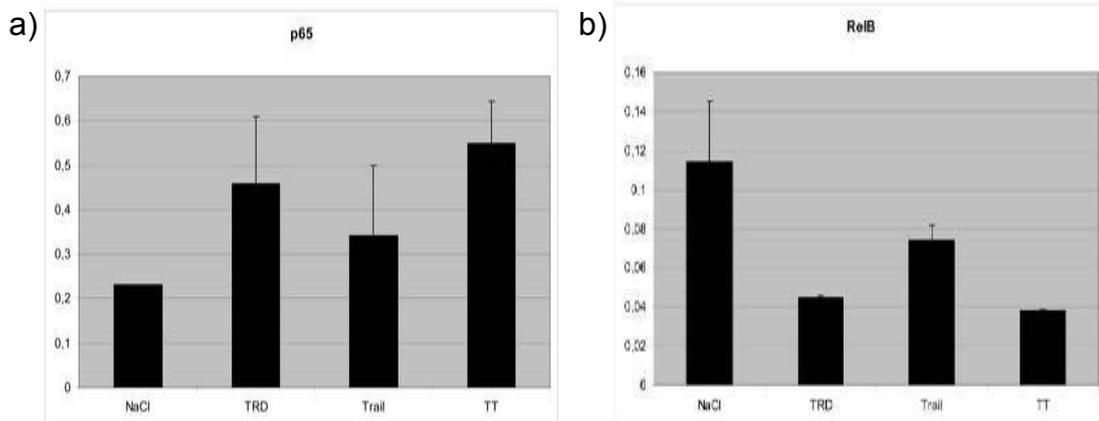


Abb. 26: NFκB-ELISA

Ergebnisse für p65/RelA (a) und RelB (b) nach 4-stündiger Inkubation mit TRD 250 µmol/l, TRAIL 50 ng/ml, TRD 250 µmol/l + TRAIL 50 ng/ml und NaCl (Kontrolle)

4.6.2 Fazit

Wenngleich die Veränderungen durch Einzelsubstanzen und Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant waren, fielen die Veränderungen durch TRD und TRAIL/TRD stets deutlicher aus als jene durch TRAIL als Einzelsubstanz.

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Taurolidin und rekombinantes TRAIL/Apo-2L in Kombination einen neuen Therapieansatz zur Behandlung des menschlichen Fibrosarkoms darstellen können.

5.1 Studienaufbau

5.1.1 Auswahl der Zelllinie

Als kleine Entität innerhalb einer Gruppe seltener Tumore gehört das Fibrosarkom zu den wenig erforschten Neoplasien. Die Verschiedenheit der Weichgewebssarkome untereinander und die Seltenheit der einzelnen Subtypen erschweren die Entwicklung spezifischer Therapiestrategien [12], so ist das Spektrum wirksamer Behandlungsmöglichkeiten, insbesondere fortgeschrittener Stadien, nach wie vor sehr begrenzt. Ergänzende und alternative Behandlungsverfahren zur Resektion – Radiatio und Chemotherapie eingeschlossen – vermochten das langfristige Outcome der Patienten bislang nicht zufriedenstellend zu verbessern ([93] u.a.).

Trotz ihrer Seltenheit sind immerhin 2.000-3.000 Menschen pro Jahr in Deutschland von Weichgewebssarkomen betroffen, das Fibrosarkom darunter eines der häufigeren. Die Suche nach neuen Möglichkeiten zur Behandlung und Kontrolle von Weichgewebssarkomen und dem Fibrosarkom im Speziellen erscheint also notwendig und sinnvoll.

Die 1974 erstmals beschriebene [173] humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 ist in zahlreichen Studien verwendet worden und ihre Kultivierung und Verwendung zur Evaluation apoptotischer Vorgänge etabliert (z.B. [116]). Das Ansprechen der Zelllinie auf Behandlung mit TRAIL oder TRD als Einzelsubstanz ist bislang nicht untersucht worden, es gibt aber zahlreiche Hinweise, dass andere Sarkome eine Sensibilität gegenüber TRAIL besitzen [61, 85, 110, 116, 222].

5.1.2 Auswahl der Testsubstanzen

5.1.2.1 TRAIL

Die apoptoseinduzierende bzw. proliferationshemmende Wirkung von rekombinantem TRAIL auf zahlreiche maligne Zelllinien in vitro [7, 49, 76, 198, 231-232] und in vivo [6-7, 64, 72, 103, 116, 130-132, 138, 179, 246, 252] ist wiederholt dargestellt worden. Durch Kombination mit Zytostatika und ionisierender Strahlung konnten synergistische Effekte und Resensibilisierung gering chemosensibler bzw. TRAIL-resistenter Zellen erreicht werden [17, 32, 117, 223] – wahrscheinlich durch verstärkte DR-Expression, vereinfachte DISC-Formation und andere Mechanismen. Eine Reihe aktueller Berichte deuten TRAIL auch als effektiv in der Behandlung von Sarkomen, insbesondere bei Kombinationsbehandlung (z.B. [222]). Vermutlich ist TRAIL in der Tumorthherapie am effektivsten in Kombination mit zusätzlichen Verfahren einsetzbar [117]. Das Fehlen systemischer Nebenwirkungen und toxischer Effekte auf Normalgewebe macht TRAIL dabei zu einem vielversprechenden Mittel [7, 115]. Aufgrund der beobachteten Toxizität einiger TRAIL-Varianten auf Hepatozyten u.a. [96, 115] erscheint das Anstreben einer möglichst niedrigen Dosierung – z.B. durch Kombination mit anderen Substanzen – dennoch sinnvoll.

5.1.2.2 TRD

Wie zuvor erwähnt, hat TRD weder kurz- noch langfristig eine toxische Wirkung, besitzt aber das Potential, Apoptose in einer Reihe von malignen Zellen zu induzieren (vgl. Tab. A6), darunter verschiedene Osteosarkom-Zelllinien [235]. Neben zytotoxischen Effekten (z.B. [27]) kann TRD Proliferation und Wachstum maligner Zellen herabsetzen (z.B. [178]), die Adhäsion hemmen (z.B. [142, 201]) und Metastasenbildung vorbeugen [92]. Außerdem vermag es Mesotheliomzellen für Cisplatin zu sensibilisieren [152]. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass TRD die Toxizität von TNF in vivo reduziert, ohne dessen Anti-Tumor-Wirkung zu verringern [134]. Dies geschieht vermutlich nicht durch Interferenz mit TNF selbst, sondern mit dessen nachgeschaltetem Signaltransduktionsweg, weitestgehend derselbe

wie für TRAIL [124]. Dies prädestiniert TRD für einen gemeinsamen Behandlungsversuch mit TRAIL.

In neueren Studien ist der gemeinsame Einsatz von TRD und TRAIL an Ösophagus- und Kolonkarzinomzellen untersucht und eine synergistische Wirkung festgestellt worden [34, 42].

5.1.3 Fazit

Soweit der Autorin bekannt, wurde die Wirkung von TRD oder der Kombination von TRAIL und TRD auf Weichgewebssarkome noch nicht untersucht. Dem effektiven Einsatz bei anderen Zelllinien zufolge entschieden wir uns für den Versuch einer Behandlung humaner HT1080 Fibrosarkomzellen mit TRD, TRAIL und der Kombination beider Substanzen.

5.2 Ergebnisse für Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung

5.2.1 Induktion von Apoptose und Nekrose

5.2.1.1 Auswahl der Methoden

Die Durchflusszytometrie hat sich bereits in vorhergehenden Studien als praktikable und valide Methode zur Detektion und Quantifizierung apoptotischer Vorgänge in Tumorzellen erwiesen, z.B. nach Einwirken von TRD [27, 180] oder TRAIL [116]. Die Translokation von PS auf die Außenseite der Zellmembran ist ein frühes Ereignis der Apoptose und kann durch das PS hoch affin bindende Protein Annexin-V [227] verlässlich detektiert werden. Durch Kombination mit geeigneten Färbungen wie PI ist auch die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose möglich [227].

Extensive DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen ist ein Charakteristikum später Apoptosestadien. In den resultierenden Einzelstrangbrüchen können die freigelegten 3'OH-Gruppen durch enzymatischen

Anbau fluoreszenzmarkierter Digoxigenin-Nukleotide (dUTP) gekennzeichnet (TUNEL) und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden [196]. Wir nutzten diese gut etablierte Methode zur qualitativen Validierung der Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie und Evaluation später Apoptosestadien.

5.2.1.2 Dosisfindung

Die Dosisfindung geschah in zwei Versuchsreihen mittels Durchflusszytometrie, um Dosis- und Zeitabhängigkeit parallel aufzuzeigen. Die bisherige Auswahl der in Studien verwendeten TRD-Dosen reicht von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 14 mmol/l , häufig verwendet wurden Konzentrationen von 10-200 $\mu\text{mol/l}$ [92]. Die Dosen mit dem stärksten apoptoseinduzierenden Effekt rangierten je nach untersuchter Zellart zwischen 9,6 $\mu\text{mol/l}$ und 2,5 mmol/l . Die Inkubationszeiten variieren ebenfalls: 1-96 Std. [92]. Ähnliches gilt für TRAIL, das in bisherigen Studien in Konzentrationen zwischen 2 ng/ml und 1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurde – besonders häufig 10-100 ng/ml – bei Inkubationszeiten von wenigen Minuten bis zu 48 Stunden [108, 200]. Meist stellten sich dabei hohe Dosen auch als besonders effektiv heraus.

Wir wählten daher zunächst ein möglichst breites Dosis-Spektrum für beide Substanzen. TRAIL 50 ng/ml erwies sich in den Versuchen zur Dosisfindung als die niedrigste Einzeldosis, die Apoptose, jedoch keine signifikante Nekrose induzierte, TRD 250 $\mu\text{mol/l}$ zeigte als Einzeldosis die höchste Rate an Apoptose und reduzierte am effektivsten die Zahl vitaler Zellen – daher wurden diese Konzentrationen (einzeln bzw. in Kombination) für die folgenden Versuche ausgewählt.

5.2.1.3 Ergebnisse für TRAIL als Einzelsubstanz

Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL als Einzelsubstanz erfolgreich apoptotischen Zelltod in HT1080 Fibrosarkomzellen induziert. Die Effekte sind dosis- und zeitabhängig. Interessanterweise bewirkten niedrigere Dosen (z.B. 10 ng/ml) eine langsame, eher ineffektive Apoptoseinduktion, während höhere Dosen (z.B. 100 ng/ml) rasch zum endgültigen Zelltod führten (vgl. 5.2.1.6). Bemerkenswert ist, dass die Wirkung durch TRAIL 50 ng/ml sich ähnlich stark wie höhere Dosen zeigte, jedoch länger anhielt und signifikant

weniger zu Nekrose führte ($p < 0,005$) – dies könnte ein für die nachhaltige Reduktion von Tumormasse in vivo günstiger Effekt sein.

Die Sensitivität gegenüber TRAIL wurde mit der Aktivität unterschiedlicher intrazellulärer Proteine, z.B. der Kaspasen [252] in Zusammenhang gebracht. Im Überblick über die Datenlage scheinen die Ergebnisse relativ zelltypspezifisch zu sein. Die Wirkmechanismen von TRAIL betreffend, wird gemeinhin angenommen, dass TRAIL Apoptose in malignen Zellen p53-unabhängig [117] über den extrinsischen Pathway [242] induziert, und zwar spezifisch über DR [108]. Diese wiederum sind für die Wirksamkeit von TRAIL notwendig, aber nicht ausreichend [109, 205]. In der Literatur finden sich außerdem Hinweise für eine Abhängigkeit vom mitochondrialen Pathway in einigen Zellen [154]. Die Beteiligung von Kaspase-10 (Cas-10) sowie Mitgliedern der Bcl-Proteinfamilie ist kontrovers diskutiert worden [117]. Shin et. al vermuteten, dass die PKCK2-regulierte Aktivierung von Pro-Kaspase-2 (Cas-2) eine Schlüsselrolle in der DR-vermittelten Apoptose spielt [200]. Nicht zuletzt scheint die Aktivität von NF κ B gewichtigen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch TRAIL zu haben [117], zahlreiche weitere Ansätze sind darüber hinaus untersucht worden (vgl. Tab. A5).

5.2.1.4 Ergebnisse für TRD als Einzelsubstanz

TRD als Einzelsubstanz induziert dosis- und zeitabhängig Apoptose und Nekrose in HT1080 Fibrosarkomzellen. Dies steht in Analogie zu bisherigen Beobachtungen der Effekte von TRD auf Tumorzellen ([27, 128, 180] u.a.). Das Muster der Dosisabhängigkeit mit maximaler Wirksamkeit bei mittlerer Konzentration – hier 250 μ mol/l – ist zum Teil auch von anderen Autoren beschrieben worden: [27, 78, 178] – zuletzt in einer aktuellen Studie an HT1080 [35]. Insgesamt stehen die Funde für Fibrosarkome also in Einklang mit bisherigen Studien zur Wirkung von TRD.

Unterschiedliche Mechanismen sind für die Apoptoseinduktion durch TRD diskutiert worden (vgl. Tab. A6), beispielsweise die Induktion verschiedener Signaltransduktionswege, Kaspasen-abhängig ([27, 235] u.a.) und – unabhängig [180]. TRD scheint außerdem die Expression des Rezeptors Fas und die Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale zu fördern, ein additiver Effekt durch Gabe von Fas-Ligand bzw. Protektion durch den Radikalfänger

N-Acetylcystein war nachweisbar [35, 92, 152, 180, 210]. Auch die veränderte Expression von Molekülen der Zelloberfläche wurde in Betracht gezogen [27, 180]. Verstärkter Efflux von Cytochrom-C wurde regelmäßig beobachtet, ist aber offenbar nicht in jedem Zelltyp essentiell für die Apoptoseinduktion [78, 180]. Inhibition von Bcl-2 und vermehrte Spaltung von PARP scheinen hingegen eine zentrale Rolle zu spielen [27, 44, 78, 178]. TRD inhibiert außerdem die Proteinsynthese in einem frühen Stadium [21, 24], Braumann et al. führen die Apoptoseinduktion in Kolonkarzinomzellen auf diese Wirkung zurück [21]. Andere Translationsinhibitoren induzieren isoliert keine Apoptose [183], für synergistische Effekte – z.B. mit TRAIL – könnte die Translationsinhibition durch TRD aber eine wichtige Rolle spielen.

5.2.1.5 Ergebnisse für die Kombination von TRD und TRAIL

Kombination der Wirksubstanzen potenzierte die zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen. Synergismus in der Reduktion vitaler Zellen konnte korrespondierend mit Studien [34, 42] an anderen Zelllinien hier für humane Fibrosarkomzellen dargestellt werden. Die Apoptoseinduktion zeigte sich durch die Substanzkombination vor allem in ihrer Kinetik verändert: ein signifikanter quantitativer Zugewinn in der Apoptoseinduktion bestand nach 6 Stunden, nicht aber zu späteren Zeitpunkten. Die Effekte traten also deutlich rascher zutage. Für die klinische Anwendung ist dies wahrscheinlich von Vorteil, da die Wirksubstanzen im Organismus nur für kurze Zeit verfügbar sind, also schnell wirken müssen. TRD beispielsweise besitzt eine Halbwertszeit von 2 Stunden [21] und scheint in wässriger Umgebung rasch abgebaut zu werden [27]. Andererseits erlauben geringe Halbwertszeiten hohe initiale Wirkstoffspiegel bei nur geringer Gefahr toxischer Nebenwirkungen und Akkumulation.

Zahlreiche Studien haben additive und synergistische Effekte für die Kombination von TRAIL mit herkömmlichen Therapieverfahren gezeigt ([17, 117], vgl. Tab. A5). Für die synergistische zytotoxische Wirkung von TRAIL und TRD kommen eine Reihe möglicher Erklärungsansätze infrage. So ist die Sensibilisierung für TRAIL-vermittelte Apoptose in anderen Studien durch Hemmung der Proteinsynthese mittels verschiedener Translationsinhibitoren

ausführlich untersucht worden [183]. TRD hemmt wie bereits erwähnt die Translation in einem frühen Stadium [21, 24]. Auch die Inhibition von NFκB begünstigt Apoptoseinduktion durch TRAIL [98, 102]. TRD wiederum inhibiert NFκB durch Oxidation von IκBα am Met45 [194]. Bereits erwähnt wurde die toxisitätsmindernde Wirkung von TRD bei gemeinsamer Anwendung mit TNF, die durch Modulation der nachfolgenden Signalkaskade zustande kommt [124, 134], welche ihrerseits dem TRAIL-induzierten Pathway gleicht. TRD bewirkt weiterhin direkt und selektiv den Tod bestimmter maligner Tumorzellen durch Fas- und FasL-Induktion [92] sowie verstärkte Kreuzvernetzung von Fas [69]. Bei Kombination von TRD mit TRAIL wurde eine korrespondierende Hochregulation von endogenem TRAIL und FADD in Ösophaguskarzinomzellen beobachtet [42]. Additive Effekte durch Induktion unabhängiger Signalwege durch die Substanzen sind zusätzlich denkbar. Insgesamt haben bisherige Studien sehr unterschiedliche Mechanismen zur Wechselwirkung von TRAIL bzw. TRD mit anderen Substanzen aufgedeckt, wir entschieden uns daher, zunächst Gen- und Proteinexpression genauer zu untersuchen.

5.2.1.6 Nekrose – eine kritische Evaluation

Für die Kombination von TRD und TRAIL konnte Synergismus in der zytotoxischen Wirksamkeit dargestellt werden, die Effekte beruhten dabei weniger auf verstärkter Apoptose- als vielmehr Nekroseinduktion. Dies ist in Bezug auf klinische Einsetzbarkeit durchaus kritisch zu betrachten, da nekrotischer Zelltod zumeist ungewollte Inflammationsreaktionen zur Folge hat. Andererseits besitzt die Nekrose ebenso wie Apoptose das Potential, Tumorzellen zu vernichten. In einer aktuellen Studie wurde darüber hinaus erstmals ein möglicher Zugewinn der durch Nekrose verursachten Inflammation für die Tumorregression diskutiert [170]. Aus dem experimentellen Ansatz ergibt sich außerdem eine einfache Erklärung: Während in vivo apoptotische Zellen und Zellfragmente phagozytiert werden, solange ihre Membranen noch intakt sind, ereignet sich in vitro das Phänomen der sogenannten sekundären Nekrose. Da keine Phagozytose stattfinden kann, schwellen die Überreste der apoptotischen Zellen schlussendlich an und rupturieren – dieser Prozess ist von primärer Nekrose

mittels Durchflusszytometrie oder TUNEL-Methode nicht differenzierbar [13]. Da insbesondere die Kombinationstherapie sehr rasch Apoptose induziert, wurden möglicherweise überwiegend späte Stadien mit bereits beginnender sekundärer Nekrose erfasst. Ergebnisse anderer Studien zur Nekroseinduktion durch die hier verwendeten Wirkstoffe variieren: Einige Zelltypen reagierten auf TRD kaum mit Nekrose [180], andere taten dies dosisabhängig [128] – analog zu unseren Versuchen. Die Effekte scheinen letztlich zelltypspezifisch zu sein. Zielgerichtete Untersuchung der Wirkmechanismen sowie Evaluation in vivo werden zur weiteren Klärung beitragen.

5.2.2 Morphologische Veränderungen/Adhäsionsverhalten

Qualitative Beobachtung der Morphologie und des Adhäsionsverhaltens der Fibrosarkomzellen erfolgte parallel zu den Versuchen in der Durchflusszytometrie.

Die nach Inkubation mit TRD lichtmikroskopisch beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie gleichen klassischen Charakteristika apoptotischer Zellen [106, 244] und sind in vorhergehenden Studien analog beschrieben worden ([27, 78, 180] u.a.), ebenso wie das Lösen von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten [201, 235]. Antiadhäsive Effekte von TRD sind bereits bekannt [27, 69, 180]. TRD setzt die Expression von Integrinen und Cadherinen in Kolonkarzinomzellen herab und verringert Tumorwachstum und Auftreten von Metastasen gleichermaßen [15]. Möglich ist auch ein Zusammenhang mit Expressionsveränderungen des Gens ARHGDI1, das mit der Inhibition eines für Zellmotilität und -wachstum von HT1080 Zellen verantwortlichen Proteins in Verbindung gebracht wird [45, 153, 245] (vgl. 5.3.1.4). Vorgreifend ist zu sagen, dass die hier dargestellten Ergebnisse eine erhöhte Plasmakonzentration für ARHGDI1 nach Behandlung mit TRD plus TRAIL zeigen. Auch zur NFκB-abhängigen Expression von Adhäsionsmolekülen [60] könnte eine Verknüpfung bestehen.

5.2.3 Proliferationshemmung

Zellvitalität sagt per se noch nichts über den Anteil sich aktiv teilender – also proliferierender – Zellen aus. Um mögliche hemmende Effekte von TRD und TRAIL auf die Proliferation von HT1080 genauer zu evaluieren, führten wir deshalb einen Zellproliferations-ELISA mittels BrdU durch.

5.2.3.1 Methode

Der Zusammenhang von Zellteilung und DNA-Synthese gestattet die Messung der Zellproliferation – oder deren Hemmung – in einer Probe anhand des Einbaus markierter Nukleotide während der Replikation; eine seit vielen Jahren erfolgreich genutzte Methode (z.B. [128]).

5.2.3.2 Ergebnis

Sowohl die Wirksubstanzen allein, als auch ihre Kombination bewirkten eine effektive Hemmung der Proliferation von HT1080 Zellen. Der Effekt durch Kombination der Substanzen war nicht signifikant größer als der von TRD allein ($p = 1,0$), aber signifikant größer als der von TRAIL allein ($p < 0,001$). Es sollte angemerkt werden, dass TRD die Proliferation allein bereits so stark supprimierte – verglichen mit der Negativkontrolle (Blank) – dass eine Verstärkung durch Zugabe von TRAIL im Sinne eines Synergismus rein rechnerisch keine Signifikanz hätte erreichen können.

Insgesamt korrespondieren die Funde mit denen anderer Arbeiten, welche den proliferationshemmenden Effekt von TRD auf andere Zelllinien demonstrierten und verschiedene Wirkmechanismen vorschlugen: Für TRD wurde beispielsweise gezeigt, dass es direkt das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hemmt – in vitro und in vivo [15, 91] und proliferationsfördernde Zytokine supprimiert [11]. Die ebenfalls beschriebene Wachstumshemmung durch TRD via Inhibition der Tumorangio-genese spielt vermutlich eher für in-vivo Modelle eine Rolle [92, 210]. Das Doxorubicin-Analogon DA-125 hingegen verringert die Proliferation von HT1080 Fibrosarkomzellen durch Beeinflussung der NFkB-abhängigen Signaltransduktion [159]. Ein Zusammenhang mit der Expression von ARHGDI A – ein bereits unter 5.2.2 erwähntes Gen, welches ein wachstums-

förderndes Protein in HT1080 Zellen inhibiert [45, 153, 245] – ist denkbar, auch die für TRD nachgewiesene Translationshemmung spielt möglicherweise eine Rolle [21]. Diese Zusammenhänge sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

5.2.4 Fazit

Wir stellten in dieser Arbeit bisher die Wirksamkeit von TRD und TRAIL – als Einzelsubstanz sowie in Kombination – auf HT1080 Fibrosarkomzellen hinsichtlich Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung fest und gaben einen Ausblick auf mögliche Wirkmechanismen, darunter die Induktion von und Interferenz mit Signaltransduktionswegen durch TRD und TRAIL [21, 27, 78, 117, 143, 178, 180, 235, 242]; außerdem vermehrte Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale [35, 92, 152, 180, 210], veränderte Expression von Molekülen der Zelloberfläche [27, 180] und Veränderungen der Proteinsynthese [21, 24] durch TRD. Als Ansätze zur Erklärung der synergistischen Effekte besprachen wir darüber hinaus die Verstärkung TRAIL-vermittelter Apoptoseinduktion durch verschiedene Ko-Mechanismen wie Hemmung der Translation [183] und Inhibition von NFκB [98, 102] – welche unter anderem durch TRD vermittelt werden können [21, 24, 194]. Mögliche Verbindungen zur (synergistischen) Inhibition des Zellwachstums ergeben sich auch auf Ebene der Genexpression [34, 45, 153, 245]. Ebenso ist ein Zusammenhang über den Transkriptionsfaktor NFκB denkbar – sowohl für Apoptoseinduktion [117] wie auch Hemmung der Proliferation [60].

5.3 Mechanismen der Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung

Nach aktueller Datenlage ist davon auszugehen, dass die apoptoseinduzierenden Effekte von TRAIL und insbesondere TRD nicht auf einen einzigen Mechanismus zurückgeführt werden können [35, 92]. Prinzipiell kommen zwei Wege infrage: einerseits Suppression anti-apoptotisch wirksamer Faktoren, andererseits Hochregulation pro-

apoptotischer [46]. Dabei kann eine Signalkaskade auf unterschiedlichen Ebenen reguliert sein [233]: durch direkte Beeinflussung von Effektor-Proteinen oder Expressionsveränderung entsprechender Gene. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Überexpression von X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in Tumorzellen Resistenz gegen TRAIL bedingt, bzw. dass eine Sensibilisierung für TRAIL auf Ebene der DISC-Formation, nämlich durch veränderte Level des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP, stattfindet [233]. Dass TRD und TRAIL als Einzelsubstanzen und auch in Kombination die Expression apoptosebezogener Gene verändern können, ist bereits demonstriert worden [42]. Wir konzentrierten uns zunächst auf mögliche Veränderungen der Genexpression in den untersuchten Zellen als Grundlage der beobachteten Effekte.

5.3.1 Modulation der Genexpression und Translation

5.3.1.1 Methoden und Auswahl der untersuchten Gene

Im Gegensatz zur Real-time-PCR bieten sog. Microarrays den Vorteil, ein Expressionsprofil von mehreren tausend Genen gleichzeitig erstellen zu können. Der für diese Arbeit verwendete high density Oligonukleotid-Mikroarray beispielsweise deckt 54.000 Probesets und ca. 38.500 Gene bzw. Transkripte ab, aus denen wir eine Reihe mit Relevanz für die apoptotische Signaltransduktion auswählten. Dass der Einsatz solch Bioinformatik-gestützter Methoden sinnvoll bei der Identifikation von Genen im Zusammenhang mit Chemosensitivität von Tumorzellen ist, wurde zum Beispiel von Nakatsu et al. gezeigt [141].

Von allen im Microarray gefilterten und verlässlich gemessenen Probesets wählten wir vor allem solche zur näheren Betrachtung aus, die eine deutliche, das heißt mehr als zweifach veränderte, Expression anzeigten. Zur anschließenden Proteindifferenzierung und -quantifizierung führten wir Western Blots mit vorangehender SDS-Gelelektrophorese durch, eine sehr gut etablierte und vielfach verwendete Methode.

5.3.1.2 Ergebnisse zur Genexpression im Überblick

Wie den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zufolge erwartet, zeigte sich im Microarray die Expression diverser Gene mit Verbindung zum apoptotischen Signalweg verändert. Die Kombination der Wirksubstanzen führte dabei teilweise zu verstärkten oder auch entgegengesetzten Expressionsveränderungen verglichen mit den Einzelsubstanzen. Das Profil der Genexpression lässt insgesamt eine kleine Zahl Gene erkennen, deren Expression sich mehr als zweifach verändert zeigte. Ausgewählte davon werden im Folgenden besprochen. Daten zu den nicht abgehandelten Genen sind in Tab. A24 (Funktionen) bzw. Tab. A19-20 (Expressionsänderungen) zusammengefasst.

5.3.1.3 Ergebnisse zur Translation im Überblick

Entsprechende Parallelen ließen sich auf Protein-Ebene nachweisen. Die Tatsache, dass die Ergebnisse des Western Blots nach einer Inkubationszeit von 4 Std. tendenziell besser mit den Daten der Genexpressionsanalyse korrelieren als nach 2 Std., ist möglicherweise der Tatsache geschuldet, dass die entsprechenden Proteine erst mit einer gewissen Latenz zur Transkription im Zytoplasma nachweisbar werden. Darüber hinaus wurde für TRD gezeigt, dass es die Translation – nicht aber die Transkription – in einem frühen Stadium blockieren kann [21], unter Umständen eine weitere Erklärung für die beobachtete Latenz.

5.3.1.4 Ergebnisse im Detail

(vgl. Ergebnisse – Tab. 18: Microarray, Veränderung der Genexpression)

In HT1080 Fibrosarkomzellen induziert TRAIL als Einzelsubstanz eine mehr als zweifache Hochregulation dreier Gene (ARHGDIA, NFKBIA, TNFAIP3) im Vergleich zur Kontrolle:

NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$) kodiert für ein Protein der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Familie, welches den proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytoplasma bindet [202], und zwar vor allem p65 in p65/p50-Heterodimeren, deren Bindung ans $\text{I}\kappa\text{B}$ -Motiv es verhindert [79]. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ist das vorherrschende $\text{I}\kappa\text{B}$ in den meisten Zellen, gebunden an RelA:p50 [148]. Charakteristisch ist die schnelle

Aktivierung von NF κ B innerhalb weniger Minuten nach Stimulation, da das funktionsfähig vorliegende Protein lediglich von seinem Inhibitor abgespalten werden muss. Da die Aktivität von NF κ B selbst mit Proliferation und Invasivität maligner Zellen korreliert [28, 159-160], wird dem Inhibitor eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben [9]. Durch Transfer eines modifizierten I κ B α und konsekutiver NF κ B-Inhibition konnten resistente Tumorzellen für eine Chemotherapie sensibilisiert werden [236]. Mutationen von I κ B α sind wiederum an der Ausbildung von Hodgkin-Lymphomen beteiligt [26].

Für NFKBIA wurde sowohl nach Behandlung mit TRAIL sowie mit TRD und der Kombination beider eine mehr als zweifache Überexpression von NFKBIA auf Gen- und Proteinebene gefunden. Ähnliches konnte bereits an Ösophaguskarzinomzellen gezeigt werden [42].

Diverse Wege der zellulären Signaltransduktion, auch mit dem Zellwachstum assoziierte, werden grundlegend von sogenannten small GTP-binding proteins beeinflusst. GTP-gebunden sind sie aktiv, GDP-gebunden inaktiv. Der Wechsel zwischen beiden Formen wird durch regulatorische Proteine veranlasst – einige erhöhen die Dissoziationsrate von GDP, andere vermindern sie: sog. GDIs (GDP-dissociation inhibitors). Zu Letzteren gehört auch Rho-GDI α (ARHGDI α) [19, 77]. Rho-GDI α inaktiviert unter anderem RhoA – ein GTP-bindendes Protein und wichtiger Regulator des Zytoskeletts, der Zelladhärenz und -motilität, welcher mit dem Vorkommen von Metastasen bei verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht wird [45, 153]. In HT1080 Zellen sind hohe Plasmaspiegel von Rho-GTP beobachtet worden. Die Hemmung von Rho durch Fasudil, ein Inhibitor der Rho-Kinase, führt in diesen Zellen zu Herabsetzung von Tumormotilität und -wachstum [245]. Durch Doxorubicin wird ARHGDI α in HT1080 Zellen supprimiert [118], durch TRAIL erfolgte hier eine mehr als zweifache Hochregulation der Expression, auch eine deutlich gesteigerte Plasmakonzentration des Proteins konnte nach 4 Std. im Western Blot gefunden werden.

TNFAIP3 (TNF α -induced protein 3), das sich in unserer Studie durch TRAIL mehr als zweifach hochreguliert zeigte – ebenfalls zuvor beim Ösophagus-

karzinom beobachtet [42] –, hemmt die NFκB-Signaltransduktion [37] und fördert auf diesem Weg möglicherweise die Apoptose. Dem entgegen wurde für TNFAIP3 auch gezeigt, dass es die TNF-vermittelte Apoptose und Nekrose vermindert [80]; sein genauer Einfluss bleibt damit unklar.

TRD als Einzelsubstanz veränderte eine noch größere Anzahl von Genen in ihrer Expression, davon eine Reihe mehr als zweifach (GADD45A, HSPA1A, HSPA1B, JUN, MAP3K14, NFKBIA, SGK). So zeigte sich das Hitzeschock-Protein HSPA1A/B in seiner Expression durch TRD sowie die Substanzkombination verglichen mit der Kontrolle mehr als zweifach hochreguliert. Überexpression dieses Proteins führt zu vermehrter Chemosensitivität von HT1080 Zellen gegenüber Mitomycin C [141]. Die apoptoseinduzierende Wirkung von Taxanen auf Sarkome kann durch Co-Behandlung mit STA-4783, einem Stimulator der Expression von HSPA1A, verstärkt werden [65].

JUN (v-jun sarcoma virus 17 oncogene homologue), ein Produkt der Aktivierung von MAP2K4, vermittelt die Apoptoseinduktion einer Reihe von Chemotherapeutika [100, 114]. Die JNK-Transkriptionsfaktor-Kaskade wird durch das TNF-Rezeptor-System aktiviert [129]. Auch durch TRAIL wird JUN JNK-abhängig aktiviert [135-136] und fördert den apoptotischen Zelltod maligner Zellen einschließlich Osteosarkomen [129]. Modulation der JNK-Aktivität hat auch in Prostatakarzinomzellen zumindest partielle Relevanz für die Sensitivität gegenüber TRAIL [183], dort vermittelt durch Translationsinhibitoren. Speziell für HT1080 Zellen wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von JUN die Expression von Metalloproteinasen der Matrix und damit die Invasivität der Zellen verringert [172]. Diese Herunterregulation ist möglicherweise durch Suppression der NFκB-Aktivierung vermittelt [160]. Interessanterweise involviert die JNK-Kaskade in größerem Maß reaktive Sauerstoffspezies [3], wie sie durch TRD vermehrt gebildet werden [152, 180]. Wir beobachteten eine Hochregulation von JUN durch die Einzelsubstanzen und Kombinationsbehandlung, mehr als zweifach durch TRD und die Kombination im Vergleich zur Kontrolle. Analoge Funde in Ösophaguskarzinomzellen wurden für TRAIL und die

Kombination beschrieben [42]. Da für JUN jedoch auch anti-apoptotische Effekte gezeigt worden sind [100], bleibt seine Rolle zunächst unklar.

MAP3K14 oder NIK (NF κ B-inducing kinase), als einziger Faktor durch TRD mehr als zweifach herunterreguliert, gehört zum TNF-Signaltransduktionsweg und aktiviert NF κ B als Co-Stimulator von IKK α [30, 195]. Zur Apoptoseinduktion muss dieser Effekt überwunden werden [117]. MAP3K14 reguliert die Aktivierung von NF κ B über verschiedene Pathways [248]. Die kurze Halbwertszeit der Kinase wird durch Wachstumssignale verlängert, MAP3K14 akkumuliert unter diesen Bedingungen und verstärkt möglicherweise die IKK- und damit NF κ B-Aktivierung – stellt somit also einen Vermittler zwischen Wachstums- und Entzündungssignalen dar. Die physiologische und pathologische Bedeutung bedarf jedoch noch weiterer Untersuchung [148]. In die Aktivierung von JNK durch TNF scheint MAP3K14 nicht involviert zu sein. Der MAPKinase-Pathway selbst kann Apoptose bewirken, indem Gene der GADD-Familie (GADD45, GADD34) induziert werden [188]. Im Vergleich zu TRAIL als Einzelsubstanz bewirkte auch die Kombination eine mehr als zweifache Suppression von MAP3K14.

SGK (serum/glucocorticoid regulated kinase), für die eine Hochregulation durch TRD und die Kombination gefunden wurde, kann die NF κ B-Signaltransduktion anstoßen und so Apoptose verhindern [250]. Hier scheint dieser Effekt von anderen, pro-apoptotischen überwogen zu werden.

Der Vollständigkeit halber soll hier nochmals NFKBIA erwähnt sein, welches nach Behandlung mit TRD sowie auch der Wirkstoffkombination ebenfalls mehr als zweifach hochreguliert wurde und in deutlich gesteigerter Plasmakonzentration nachweisbar war. Zur Induktion durch TRD ist anzumerken, dass dieses Berichten zufolge die Aktivierung von NF κ B nicht nur indirekt über NFKBIA hemmt, sondern auch durch direkte Interferenz [194].

Eine gesteigerte Translation bewirkten TRD und die Kombination auch bei dem ebenfalls bereits genannten ARHGDI1. Dies korreliert mit der beobachteten Hemmung der Proliferation, insbesondere durch die

Wirkstoffkombination, und ist darüber hinaus ein möglicher Grund für die Ablösung der Zellen vom Untergrund und ihre morphologischen Veränderungen. Nicht erklärt werden können bisher die Funde, dass sich die Genexpression von ARHGDI1 durch die Kombinationsbehandlung und durch TRD verringerte, obgleich das Protein im Western Blot in höheren Plasmakonzentrationen vorzuliegen schien.

Die Kombination von TRD und TRAIL führte – über die teilweise korrelierenden Ergebnisse mit TRD als Einzelsubstanz hinaus – zu einer wiederum größeren Anzahl von Genexpressionsveränderungen, davon viele mehr als zweifach (AXL, BAG5, BIRC3, DUSP1, GADD34, GADD45A, HSPA1A, HSPA1B, IRF1, JUN, MYC, NFKB1A).

Für die Hochregulation von GADD45A – hier sowohl durch TRD und als auch die Kombinationsbehandlung mehr als zweifach verglichen mit der Kontrolle – wurde ein Zusammenhang mit vermehrter Apoptose und p53-unabhängigem Arrest des Zellzyklus bei einer Reihe von Weichgewebs-sarkomen gezeigt [254]. Wie GADD34, ein weiteres Genprodukt der GADD-Familie, wirkt GADD45A pro-apoptotisch [188]. Es hemmt die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Kaskade sowie NFκB – Transkriptionsfaktoren, die mit Tumorerkrankungen assoziiert sind [95, 114, 129, 157]. Darüber hinaus bindet es Mediatoren der DNA-Replikation und -Reparation – hindert Zellen also daran, in die S-Phase einzutreten [204]. Tatsächlich scheinen erhöhte GADD45A-Level bei Rhabdomyosarkomen mit weniger aggressivem Tumorverhalten verbunden zu sein [97]. Interessant ist dabei, dass GADD45A möglicherweise TNF-Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität antagonisieren kann [157] – ein Effekt, der für TRD gezeigt wurde [134], welches GADD45 hier, wie gesagt, hochregulierte.

GADD34/PPP1R15A, ebenfalls mehr als zweifach überexprimiert nach Behandlung mit TRD bzw. der Kombination, verstärkt die suppressive Wirkung seines Verwandten GADD45 auf das Zellwachstum. Gesteigerte Expression des Gens, z.B. durch chemosensibilisierende Substanzen, kann

den Effekt von Zytostatika wie Platinderivaten potenzieren [62]. Ähnlich wie TRAIL wirkt es vermutlich p53-unabhängig [218].

NFKBIA, HSPA1A/B und JUN, allesamt durch die Kombination mehr als zweifach hochreguliert, sind bereits genannt worden. Auch die gesteigerten Plasmakonzentrationen von NFKBIA und ARHGDI1 bzw. mögliche Zusammenhänge wurden diskutiert.

BIRC3 wird mit Chemoresistenz bei Ewing-Sarkomen und Rhabdomyosarkomen [107], sowie auch beim Prostatakarzinom [145] in Verbindung gebracht. IAPs (inhibitor of apoptosis protein) blockieren bestimmte Kaspasen durch Bindung [117] – antagonisiert werden kann diese Inhibition zum Beispiel durch das mitochondriale Protein Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases /direct IAP binding protein with low pI) [54]. c-IAP2 blockiert den TNF α -vermittelten Zelltod, indem es mit zwei dem TNF-Rezeptor1 nachgeschalteten Faktoren (TRAF1, TRAF2) interagiert. Die NF κ B-Signalkaskade reguliert c-IAP2 über vermehrten Abbau von MAP3K14 [224] – seinerseits vor allem durch TRD supprimiert. BIRC3 selbst wird durch die Wirkstoffkombination mehr als zweifach herunterreguliert. Unter Einbeziehung der Ergebnisse für die Einzelsubstanzen zeigt sich hier eindrucksvoll ein Effekt durch Kombination der Substanzen: TRD besaß nur einen geringen, tendenziell supprimierenden Effekt; für TRAIL als Einzelsubstanz hingegen ergab sich eine mehr als zweifache Hochregulation in der PCR. Eine mögliche Erklärung für Letzteres liefern Beobachtungen, denen zufolge TRAIL die Expression anti-apoptotischer Mediatoren wie BIRC2 und BIRC3 in einigen malignen Tumorzellen verstärkt, wahrscheinlich über NF κ B-Inaktivierung [162, 167].

Synergistische Effekte zeigten sich weiterhin an folgenden Genen: IRF1 (interferone regulatory factor) hemmt das Zellwachstum und induziert Apoptose durch Aktivierung der Kaspasen 1 und 7 [95, 97]. Weiterhin hemmt es die NF κ B-abhängige Aktivierung der Matrix-Metallo-Proteinase-9 (MMP9) [157]. Sowohl TRD wie auch TRAIL als Einzelsubstanz führen zur Überexpression von IRF1. Eine mehr als zweifache Hochregulation konnte

jedoch nur nach Kombinationsbehandlung der Zellen beobachtet werden: ein additiver Effekt der Substanzen.

MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene), welches JNK-abhängig Apoptose durch Anheben der p53-Level induziert [34, 42], wird durch TRD als Einzelsubstanz hochreguliert, TRAIL hingegen verändert die Expression nicht. Die Kombinationsbehandlung wiederum führt synergistisch zu einer mehr als zweifachen Hochregulation.

Noch deutlicher zeigt sich der Synergismus beider Testsubstanzen an BAG5 (BCL2-associated athanogene 5). Mitglieder der BAG-Proteinfamilie hemmen das für korrekte Proteinfaltung verantwortliche Chaperon Hsp70 und fördern Wachstum und -überleben von Tumorzellen [172]. TRD bewirkt hier eine fast zweifache Hochregulation während TRAIL als Einzelsubstanz keine Auswirkung auf die Expression von BAG5 zu haben scheint. Die Wirkstoffkombination hingegen führt zu einer mehr als zweifachen Suppression des Gens, passend zu ihrem apoptoseinduzierenden und wachstumshemmenden Effekt.

Weitere Beispiele für das synergistische Zusammenspiel der Testsubstanzen in Kombination sind AXL (AXL receptor tyrosine kinase), DUSP1 (dual specificity phosphatase 1) und die bereits genannte SGK: so ist eine mehr als zweifache Hochregulation durch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Wenngleich die genannten Gene überwiegend mit anti-apoptischen Funktionen in Verbindung gebracht werden (vgl. Tab. A24), stellt dies nicht notwendigerweise einen Widerspruch zur zytotoxischen Wirkung durch TRD und TRAIL dar. Physiologisch wie Pharmaka-induziert existieren zahlreiche Gegenregulationsmechanismen. So führt TNF beispielsweise zum apoptotischen Zelltod, bewirkt aber gleichzeitig die Hochregulation anti-apoptischer Gene wie FADD, XIAP, NFκB oder Proteinen der Bcl-2-Familie [95]. Von den genannten Genen konnten in dieser Studie nur für FADD und Bcl2l1 Veränderungen der Expression gefunden werden: FADD wurde durch TRAIL und TRD in Kombination herunterreguliert, Bcl2l1 hochreguliert durch TRAIL, aber herunterreguliert durch TRD und die Kombination (vgl. Tab. A19-20). Da die Apoptoseinduktion durch TRAIL bei Überexpression von Bcl-2-Proteinen

gehemmt wird [63], können die Einflüsse auf Bcl2l1 möglicherweise zum Teil die synergistischen Effekte der Substanzkombination erklären. Damit liefern auch viele der nur diskret veränderten Gene Erklärungsansätze für Wirksamkeit und Synergismus der Testsubstanzen.

Interessanterweise gab es nur ein Gen mit zweifacher Expressionsveränderung im Vergleich von TRD/TRAIL-Zellen mit solchen, die lediglich mit TRD allein inkubiert worden waren: MCL-1 (myeloid cell leukemia sequence 1 – Bcl2-related), das von einer Reihe Weichgewebssarkome exprimiert wird und Apoptose unterbindet, zeigte sich herunterreguliert. In HT1080 Zellen führt die Inhibition von MCL-1 in Kombination mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid signifikant verstärkt zur Apoptose [219].

Auf der anderen Seite ergab sich für eine Reihe von Genen eine mehr als zweifache Expressionsänderung beim Vergleich der Kombinationsbehandlung mit TRAIL als Einzelsubstanz. MAP3K1 beispielsweise wies so eine mehr als zweifache Herunterregulation auf. Die mit Microarray und PCR erreichten Ergebnisse korrelierten dabei durchweg gut miteinander für jede der eingesetzten Testsubstanzen. MAPK wird durch MEKK (MAP kinase kinase) und JNK aktiviert; die Hemmung von MEKK verstärkt den apoptoseinduzierenden Effekt von TNF α auf Fibrosarkomzellen [236]. Ein Zusammenhang der Herunterregulation von MAP3K1 mit der verstärkten Zytotoxizität von TRD in Kombination mit TRAIL erscheint daher naheliegend.

5.3.1.6 Fazit

Die Expression einer Reihe von Genen wird korrespondierend zu ihrer Funktion durch TRD und TRAIL beeinflusst. TRD als Einzelsubstanz bewirkt analog zu Funden vorheriger Arbeiten zahlreiche und ausgeprägte Expressionsveränderungen [42, 180, 210], wohingegen TRAIL als DR-Ligand [166, 242] und direkter Apoptoseinduktor [108, 242] eine eher kleine Anzahl von Genen beeinflusst. Die Kombination verstärkt die Effekte der Einzelsubstanzen und führt zur synergistischen Induktion einer Reihe von Genen, überwiegend mit Tendenz zur Förderung von Apoptose. Für einzelne

Gene ergeben sich teils widersprüchliche Resultate, die nach derzeitigem Stand der Forschung noch nicht sinnvoll erklärt werden können. Die Beobachtungen in der Durchflusszytometrie lassen aber erkennen, dass mögliche anti-apoptotische Effekte der Testsubstanzen bei weitem von den pro-apoptotischen überwogen werden. Eine erste Interpretation der Daten zeigt außerdem, dass viele der involvierten Gene auf den NFκB-Signaltransduktionsweg als entscheidenden Faktor hinweisen.

5.3.2 Modulation der NFκB-Signalkaskade

In seiner aktiven, ungebundenen Form disloziert NFκB in den Zellkern [9, 202]. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors korreliert also direkt mit seiner Nachweisbarkeit im Kern und ist somit im Kernextrakt z.B. mittels ELISA bestimmbar.

5.3.2.1 NFκB-Signaltransduktion

NFκB gilt gemeinhin als anti-apoptotisch, pro-proliferatorisch und pro-inflammatorisch [148, 202]. Der Transkriptionsfaktor wird TRADD-, TRAF3- und FADD-abhängig aktiviert und spielt unter anderem eine Schlüsselrolle im Überleben von Tumorzellen durch Induktion anti-apoptotischer Gene wie Bcl2, Bcl2l1, vascular endothelial growth factor (VEGF) und XIAP [95]. Davon hat z.B. die Inhibition von VEGF bereits therapeutische Anwendung gefunden [86]. Die Aktivierung der TNFα-vermittelten Signaltransduktion ist effizienter, wenn gleichzeitig der NFκB-Pathway blockiert wird [236], Inhibition von NFκB vermag Zellen für den TNF-vermittelten Zelltod zu sensibilisieren, vermutlich durch Hemmung der inaktivierenden Wirkung auf JNK [94]. Resistenzen gegen Doxorubicin können durch NFκB vermittelt sein [87], ebenso Resistenzen gegen TRAIL-vermittelte Apoptose [174]. Zwar reicht einer weiteren Studie zufolge NFκB-Aktivierung allein nicht in allen Zelltypen aus, um TRAIL-vermittelte Apoptose zu inhibieren [88], dennoch scheint NFκB entscheidenden Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch TRAIL zu haben [117, 174].

Auch pro-apoptotische Ziel-Gene von NFκB sind bekannt. Ob der Transkriptionsfaktor aber Apoptose fördert oder inhibiert, hängt offenbar von Zelltyp und induzierendem Stimulus ab [10]. Dysregulation von NFκB ist ein Kennzeichen von Tumorzellen [148], es wird überexprimiert bei Inflammation und in Tumoren. Auch die Proliferation von HT1080 Zellen wird durch NFκB-abhängige Signaltransduktion vermittelt [28, 159] und kann durch Modulation des Pathways herabgesetzt werden [159]. Aktuelle Studien zeigen außerdem, dass die Invasivität von Tumoren durch Hemmung der NFκB-Aktivität signifikant gesenkt wird [158] – ein weiterer Hinweis, dass der Transkriptionsfaktor für viele maligne Eigenschaften von HT1080 ein entscheidendes Element ist. Auf den möglichen Zusammenhang der NFκB-vermittelten Expression von Adhäsionsmolekülen [60] mit der beobachteten Störung der Zelladhäsion wurde bereits hingewiesen.

Interessanterweise induziert TRAIL selbst den NFκB-Signalweg [46, 48, 183, 193]. Auch TNF und andere Mitglieder dieser Proteinfamilie bewirken eine Hochregulation anti-apoptotischer Faktoren wie NFκB [95]. TRD hemmt die Aktivierung von NFκB sowohl indirekt über NFKBIA als auch durch Oxidation von IκBα am Met45 [194] – einer der besprochenen Erklärungsansätze für die synergistische Wirkung der Kombinationsbehandlung mit TRAIL und TRD. Andererseits induziert TRD die vermehrte Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale – die wiederum unter anderem den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren können [180]. Inflammatorische Signale in Verbindung mit einer Inhibition der Proteinsynthese bewirken außerdem synergistisch eine verstärkte NFκB-Aktivierung, vermutlich weil bei Syntheseinhibition der Pool des – ungebunden instabilen – IκBα (5-10 Min. Halbwertszeit) sehr rasch aufgebraucht ist und NFκB vermehrt freigesetzt wird [148]. Es sei hier nochmals erwähnt, dass TRD die Translation blockieren kann [21]. Bezugnehmend auf die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit ist eine Beeinflussung von NFκB durch TRD und TRAIL in HT1080 Fibrosarkomzellen auch via NFKBIA, MAP3K14 oder auch TNFAIP3 denkbar.

5.3.2.2 NFκB-Untereinheiten

Wie in der Einleitung besprochen, existieren fünf Untereinheiten von NFκB, die jeweils als Homo- und Heterodimere vorliegen. Von 15 theoretisch denkbaren Dimeren fungieren neun potentiell als Aktivatoren der Transkription (vgl. Tab. A25), während andere zwar mit DNA interagieren, aber nicht die Transkription aktivieren, solange sie nicht an spezifische Ko-Aktivator-Proteine binden [148]. Für einige Dimere ist bekannt, dass sie gar nicht an DNA binden [82]. Rel-Untereinheiten enthalten c-terminale Transcriptional Activation Domains (TADs), die es ihnen ermöglichen, die Genexpression zielgerichtet zu aktivieren. p50 und p52 besitzen diese nicht. p50- und p52-Homodimere supprimieren also wahrscheinlich die Transkription, solange sie nicht an ein Protein binden, das eine TAD enthält – wie RelA, c-Rel oder RelB [82, 218].

Die Datenlage spricht dafür, dass in der einzelnen Zelle das Gleichgewicht von Zelltod und Überleben nach Einwirken äußerer Stimuli unter anderem von der Aktivierung spezifischer NFκB/Rel-Proteine abhängt [168].

Tatsächlich ergab das NFκB-Aktivitäts-Assay aus Kernextrakt der hier verwendeten Zellen unterschiedliche Aktivitätsänderungen durch TRD, TRAIL und die Kombination für die einzelnen Untereinheiten. Insgesamt erreichten die Ergebnisse kein signifikantes Maß, tendenziell zeigte sich jedoch eine größere Effektivität von TRD im Vergleich zu TRAIL. Dies korrespondiert zum Teil mit vorherigen Beobachtungen TRAIL-vermittelter NFκB-Aktivierung [46, 48, 183, 193]. Die Wirkstoffkombination schien die Einzelsubstanzen mitunter noch übertreffen oder modulieren zu können. Viele der bisher beobachteten Wirkungen von TRD und TRAIL auf HT1080 Zellen weisen also auf den NFκB-Signalweg hin [43], die gemessenen Effekte auf den Transkriptionsfaktor fallen jedoch vergleichsweise gering aus. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Dynamik der NFκB-Aktivität bzw. Dimer-Komposition. Eine aktuelle Studie demonstrierte zum Beispiel, dass bei Einwirken eines Wachstumssignals durch induzierte Degradation von IκBδ zunächst RelA:p50 und RelB:p50 freigesetzt werden. Die induzierte Neusynthese von p100 und dessen Prozessierung zu p52 wirken sich nach 3 Std. aus, die Dimer-Komposition verändert sich dann von RelA:p50

(RelB:p50) zu RelB:p52 (RelA:p52) [148]. In diesem Zusammenhang ist weiterhin erwähnenswert, dass z.B. TNF die rasche Degradation der NFκB-Inhibitorproteine und deren ebenso rasche Re-Synthese fördert. Bei längerfristiger Einwirkung kann es so zu oszillierender NFκB-Aktivität kommen [148]. Generell wird das Repertoire an NFκB-Dimeren für rasch veränderbar durch entzündliche oder RelA-induzierende Stimuli gehalten. Allerdings ist unklar, wie dynamisch oder reversibel die resultierenden Veränderungen sind und ob sie innerhalb von Stunden oder Tagen geschehen, bzw. ob sie von vorübergehender oder anhaltender Natur sind [149].

Zahlreiche Studien zu den Untereinheiten von NFκB zeigen, dass über die beteiligten Untereinheiten hinaus auch deren Zusammenspiel im Dimer sowie Wechselwirkungen mit Proteinen außerhalb der NFκB-Familie über ihren Einfluss auf die Genexpression entscheiden (vgl. Tab. A25).

5.3.2.3 Fazit

Zusammengefasst ergab die Quantifizierung der NFκB-Subunits mittels ELISA nach 4-stündiger Inkubationszeit mit den Wirkstoffen eine entgegengesetzte Regulation einzelner Untereinheiten. Obwohl die Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle insgesamt nicht signifikant waren, traten interessanterweise durch TRD und TRD plus TRAIL deutlich ausgeprägtere Effekte zutage als durch TRAIL allein.

Unter Berücksichtigung der Veränderungen von Genexpression und Proteinkonzentration, zusätzlich zu den Ergebnissen des NFκB-Aktivitäts-Assay, scheinen die Auswirkungen von TRD, TRAIL und der Kombination beider Substanzen eng mit NFκB und der damit assoziierten Signaltransduktion zusammenzuhängen. Die Veränderungen der DNA-Bindungsaktivität von p65/RelA und RelB, die im ELISA festgestellt wurden, können diese Annahme möglicherweise weiter stützen. Genaue Kenntnisse über die Funktion dieser Faktoren sind allerdings, besonders was Weichgewebssarkome anbetrifft, noch so knapp, dass wir von weitergehender Interpretation absehen.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass TRD und TRAIL in humanen HT1080 Fibrosarkomzellen effektiv Apoptose induzieren und die Proliferation hemmen. Die Kombination erwies sich dabei als wirksamer als die Einzelsubstanzen, in Bezug auf Zytotoxizität und Nekroseinduktion konnte ein synergistisches Zusammenwirken beobachtet werden. Zahlreiche Mechanismen kommen als Grundlage der Effekte infrage und eine Reihe von Genen scheint involviert zu sein. Die Ergebnisse deuten auf den NF κ B-Signaltransduktionsweg als ein entscheidendes Element in der Regulation der TRD/TRAIL-vermittelten Apoptose.

Ein nächster Schritt könnten daher gezielte Versuche zur NF κ B-Hemmung oder Aktivierung von I κ B sein. Vieles spricht bereits jetzt für einen kombinierten Einsatz der getesteten Wirkstoffe, weitere potentielle Vorteile machen die Kombination der Wirkstoffe aus klinischer Sicht zusätzlich interessant: So ist denkbar, dass TRD analog zum kombinierten Einsatz mit TNF möglicherweise einen Schutz vor potentiell toxischen Effekte von TRAIL bietet. Auswirkungen und Effektivität der Testsubstanzen in vivo werden aktuell durch ihre Erprobung an HT1080 Fibrosarkomzellen im Xenograft-Modell evaluiert.

6 Zusammenfassung

Weichgewebssarkome, darunter auch das bisher wenig erforschte Fibrosarkom, stellen nach wie vor ein therapeutisches Dilemma dar, weil effektive Behandlungsstrategien über die radikale Resektion hinaus fehlen.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass TRAIL, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, und Taurolidin (TRD), ein synthetisches Aminosäure-Derivat, in humanen Fibrosarkomzellen in signifikantem Maß den apoptotischen Zelltod induzieren und die Proliferation verringern. Durch Kombination der Substanzen wurde eine synergistisch gesteigerte Zytotoxizität erreicht.

Dafür wurden humane Fibrosarkomzellen (HT1080) in Kultur mit den Wirksubstanzen inkubiert, anschließend Zellvitalität, Apoptose und Nekrose im TUNEL-Assay dargestellt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Neben Proliferationsassays analysierten wir Veränderungen auf Ebene der Gen- und Proteinexpression mittels RNA-Microarray und Real-time-PCR bzw. im Western Blot. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB wurde mittels ELISA untersucht.

Bezüglich möglicher Wirkmechanismen erreichte TRD als Einzelsubstanz analog zu Ergebnissen vorheriger Arbeiten zahlreiche und ausgeprägte Veränderungen verschiedener Gene mit Bezug zum apoptotischen Signalweg. TRAIL als direkter Apoptoseinduktor beeinflusste eine kleinere Anzahl von Genen. Die Kombination verstärkte die Effekte der Einzelsubstanzen und führte zur teils synergistischen Induktion einer Reihe von Genen, überwiegend mit pro-apoptotischer Tendenz. Für eine Auswahl dieser Gene gelang eine gute Reproduktion der Effekte auf Proteinebene, darunter NFKBIA, ein Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB. Dysregulation des überwiegend anti-apoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors ist ein Kennzeichen vieler Tumorzellen und vermittelt u.a. Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Insgesamt besteht für viele der involvierten Gene ein

Zusammenhang zum NFκB-Signaltransduktionsweg. Das NFκB-Assay ergab hier eine entgegengesetzte Regulation diverser Untereinheiten des Transkriptionsfaktors.

Zusammenfassend zeigte sich, dass TRD und TRAIL in humanen Fibrosarkomzellen effektiv Apoptose induzieren und die Proliferation hemmen. Eine Reihe von Genen scheint dabei involviert zu sein und es gibt Hinweise auf den NFκB-Signalweg als entscheidenden Regulator der TRD/TRAIL-vermittelten Apoptose. Weiterführend wären nun gezielte Versuche zur NFκB-Hemmung denkbar. Auswirkungen und Effektivität der Testsubstanzen in vivo werden gegenwärtig durch ihre Erprobung an HT1080 Fibrosarkomzellen im Xenograft-Modell evaluiert.

Literaturverzeichnis

- [1] Abraham, S.M. and Clark, A.R. (2006). Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses. *Biochem Soc Trans* **34 (6)**, 1018-23
- [2] Abramjuk, C., Bueschges, M., Schnorr, J., Jung, K., Staack, A. and Lein, M. (2009). Divergent effects of taurolidine as potential anti-neoplastic agent: inhibition of bladder carcinoma cells in vitro and promotion of bladder tumor in vivo. *Oncol Rep* **22 (2)**, 409-14
- [3] Adler, V., Yin, Z., Tew, K.D. and Ronai, Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18 (45)**, 6104-11
- [4] An, J., Sun, Y.P., Adams, J., Fisher, M., Beldegrun, A. and Rettig, M.B. (2003). Drug interactions between the proteasome inhibitor bortezomib and cytotoxic chemotherapy, tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9 (12)**, 4537-45
- [5] Antman, K., Crowley, J., Balcerzak, S.P., Rivkin, S.E., Weiss, G.R., Elias, A., Natale, R.B., Cooper, R.M., Barlogie, B. and Trump, D.L. (1993). An intergroup phase III randomized study of doxorubicin and dacarbazine with or without ifosfamide and mesna in advanced soft tissue and bone sarcomas. *J Clin Oncol* **11 (7)**, 1276-85
- [6] Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11 (2)**, 255-60
- [7] Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z. and Schwall, R.H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **104 (2)**, 155-62
- [8] Baker, D.M., Jones, J.A., Nguyen-Van-Tam, J.S., Lloyd, J.H., Morris, D.L., Bourke, J.B., Steele, R.J. and Hardcastle, J.D. (1994). Taurolidine peritoneal lavage as prophylaxis against infection after elective colorectal surgery. *Br J Surg* **81 (7)**, 1054-6
- [9] Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107 (3)**, 241-6
- [10] Barkett, M. and Gilmore, T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18 (49)**, 6910-24

- [11] Bedrosian, I., Sofia, R.D., Wolff, S.M. and Dinarello, C.A. (1991). Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* **3 (6)**, 568-75
- [12] Benjamin, R., Pisters, P., Helman, L.J., Bramwell, V., Rubin, B.P., O' Sullivan, B. (2008). *Sarcomas of Soft Tissue*. in: *Clinical Oncology*. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2009-56
- [13] Berghe, T.V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W. and Vandenaabeele, P. (2009). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* **17 (6)**, 922-30
- [14] Blenkarn, J. (1987). The antibacterial and antiendotoxin activity of Taurolidine in combination with antibiotics. *Surg Res Commun* **2**, 149-155
- [15] Bobrich, E., Braumann, C., Opitz, I., Menenakos, C., Kristiansen, G. and Jacobi, C.A. (2007). Influence of intraperitoneal application of taurolidine/heparin on expression of adhesion molecules and colon cancer in rats undergoing laparoscopy. *J Surg Res* **137 (1)**, 75-82
- [16] Bodmer, J.L., Meier, P., Tschopp, J. and Schneider, P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **275 (27)**, 20632-7
- [17] Bouralexis, S., Clayer, M., Atkins, G.J., Labrinidis, A., Hay, S., Graves, S., Findlay, D.M. and Evdokiou, A. (2004). Sensitivity of fresh isolates of soft tissue sarcoma, osteosarcoma and giant cell tumour cells to Apo2L/TRAIL and doxorubicin. *Int J Oncol* **24 (5)**, 1263-70
- [18] Bouralexis, S., Findlay, D.M. and Evdokiou, A. (2005). Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* **10 (1)**, 35-51
- [19] Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348 (6297)**, 125-32
- [20] Braumann, C., Ordemann, J., Kilian, M., Wenger, F.A. and Jacobi, C.A. (2003). Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy. *Clin Exp Metastasis* **20 (5)**, 387-94
- [21] Braumann, C., Henke, W., Jacobi, C.A. and Dubiel, W. (2004). The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis. *Int J Cancer* **112 (2)**, 225-30

- [22] Braumann, C., Schoenbeck, M., Menenakos, C., Kilian, M. and Jacobi, C.A. (2005). Effects of increasing doses of a bolus injection and an intravenous long-term therapy of taurolidine on subcutaneous (metastatic) tumor growth in rats. *Clin Exp Metastasis* **22** (1), 77-83
- [23] Braumann, C., Winkler, G., Rogalla, P., Menenakos, C. and Jacobi, C.A. (2006). Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case. *World J Surg Oncol* **4**, 34
- [24] Braumann, C., Tangermann, J., Jacobi, C.A., Muller, J.M. and Dubiel, W. (2008). Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini Rev Med Chem* **8** (5), 421-8
- [25] Braumann, C., Gutt, C.N., Scheele, J., Menenakos, C., Willems, W., Mueller, J.M. and Jacobi, C.A. (2009). Taurolidine reduces the tumor stimulating cytokine interleukin-1beta in patients with resectable gastrointestinal cancer: a multicentre prospective randomized trial. *World J Surg Oncol* **7**, 32
- [26] Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F. and Hay, R.T. (1999). Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* **18** (20), 3063-70
- [27] Calabresi, P., Goulette, F.A. and Darnowski, J.W. (2001). Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent. *Cancer Res* **61** (18), 6816-21
- [28] Campbell, K.J., O'Shea, J.M. and Perkins, N.D. (2006). Differential regulation of NF-kappaB activation and function by topoisomerase II inhibitors. *BMC Cancer* **6**, 101
- [29] Chaput, N., De Botton, S., Obeid, M., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Panaretakis, T., Flament, C., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2007). Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. *J Mol Med* **85** (10), 1069-76
- [30] Chaudhary, P.M., Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L. and Hood, L. (2000). Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* **19** (39), 4451-60
- [31] Cheng, E.Y., Dusenbery, K.E., Winters, M.R. and Thompson, R.C. (1996). Soft tissue sarcomas: preoperative versus postoperative radiotherapy. *J Surg Oncol* **61** (2), 90-9
- [32] Chinnaiyan, A.M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D.A., Shanaiah, M., Chenevert, T.L., Ross, B.D. and Rehemtulla, A. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and

ionizing radiation in breast cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A **97 (4)**, 1754-9

- [33] Chiu, H.W., Lin, J.H., Chen, Y.A., Ho, S.Y. and Wang, Y.J. (2010). Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances cell-killing effects in human fibrosarcoma cells in vitro and in vivo through induction of both autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6 (3)**, 353-65
- [34] Chromik, A.M., Daigeler, A., Hilgert, C., Bulut, D., Geisler, A., Liu, V., Otte, J.M., Uhl, W. and Mittelkotter, U. (2007). Synergistic effects in apoptosis induction by taurolidine and TRAIL in HCT-15 colon carcinoma cells. *J Invest Surg* **20 (6)**, 339-48
- [35] Chromik, A.M., Daigeler, A., Bulut, D., Flier, A., May, C., Harati, K., Roschinsky, J., Sulberg, D., Ritter, P.R., Mittelkotter, U., Hahn, S.A. and Uhl, W. (2010). Comparative analysis of cell death induction by Taurolidine in different malignant human cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 21
- [36] Clevenger, C.V., Thickman, K., Ngo, W., Chang, W.P., Takayama, S. and Reed, J.C. (1997). Role of Bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, Ba/F3 and Nb2. *Mol Endocrinol* **11 (5)**, 608-18
- [37] Cooper, J.T., Stroka, D.M., Brostjan, C., Palmetshofer, A., Bach, F.H. and Ferran, C. (1996). A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem* **271 (30)**, 18068-73
- [38] Cooper, S., Ranger-Moore, J. and Bowden, T.G. (2005). Differential inhibition of UVB-induced AP-1 and NF-kappaB transactivation by components of the jun bZIP domain. *Mol Carcinog* **43 (2)**, 108-16
- [39] Cormier, J.N. and Pollock, R.E. (2004). Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin* **54 (2)**, 94-109
- [40] Cortes Sempere, M., Rodriguez Fanjul, V., Sanchez Perez, I. and Perona, R. (2008). The role of the NFkappaB signalling pathway in cancer. *Clin Transl Oncol* **10 (3)**, 143-7
- [41] Da Costa, M.L., Redmond, H.P. and Bouchier-Hayes, D.J. (2001). Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery. *J Surg Res* **101 (2)**, 111-9
- [42] Daigeler, A., Chromik, A.M., Geisler, A., Bulut, D., Hilgert, C., Krieg, A., Klein-Hitpass, L., Lehnhardt, M., Uhl, W. and Mittelkotter, U. (2008). Synergistic apoptotic effects of taurolidine and TRAIL on

squamous carcinoma cells of the esophagus. *Int J Oncol* **32 (6)**, 1205-20

- [43] Dalen, H. and Neuzil, J. (2003). Alpha-tocopheryl succinate sensitises a T lymphoma cell line to TRAIL-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB activation. *Br J Cancer* **88 (1)**, 153-8
- [44] Darnowski, J.W., Goulette, F.A., Cousens, L.P., Chatterjee, D. and Calabresi, P. (2004). Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **54 (3)**, 249-58
- [45] de Angelis, P.M., Fjell, B., Kravik, K.L., Haug, T., Tunheim, S.H., Reichelt, W., Beigi, M., Clausen, O.P., Galteland, E. and Stokke, T. (2004). Molecular characterizations of derivatives of HCT116 colorectal cancer cells that are resistant to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *Int J Oncol* **24 (5)**, 1279-88
- [46] de Vries, E.G., Timmer, T., Mulder, N.H., van Geelen, C.M., van der Graaf, W.T., Spierings, D.C., de Hooge, M.N., Gietema, J.A. and de Jong, S. (2003). Modulation of death receptor pathways in oncology. *Drugs Today (Barc)* **39 (Suppl C)**, 95-109
- [47] Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G. and Smith, C.A. (1997). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* **186 (7)**, 1165-70
- [48] Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A. and Goodwin, R.G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7 (6)**, 813-20
- [49] Dejosez, M., Ramp, U., Mahotka, C., Krieg, A., Walczak, H., Gabbert, H.E. and Gerharz, C.D. (2000). Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ* **7 (11)**, 1127-36
- [50] DeLaney, T.F., Spiro, I.J., Suit, H.D., Gebhardt, M.C., Hornicek, F.J., Mankin, H.J., Rosenberg, A.L., Rosenthal, D.I., Miryousefi, F., Ancukiewicz, M. and Harmon, D.C. (2003). Neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy for large extremity soft-tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **56 (4)**, 1117-27
- [51] Demarchi, F., Verardo, R., Varnum, B., Brancolini, C. and Schneider, C. (2001). Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem* **276 (34)**, 31738-44
- [52] Devita VT, L.T., Rosenberg SA (2008). *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 8th ed, Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia

- [53] Donato Di Paola, E. and Nielsen, O.S. (2002). The EORTC soft tissue and bone sarcoma group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Eur J Cancer* **38 (Suppl 4)**, 138-41
- [54] Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102 (1)**, 33-42
- [55] Duus, K., Pagh, R.T., Holmskov, U., Hojrup, P., Skov, S. and Houen, G. (2007). Interaction of calreticulin with CD40 ligand, TRAIL and Fas ligand. *Scand J Immunol* **66 (5)**, 501-7
- [56] Eggermont, A.M., Schraffordt Koops, H., Klausner, J.M., Kroon, B.B., Schlag, P.M., Lienard, D., van Geel, A.N., Hoekstra, H.J., Meller, I., Nieweg, O.E., Kettelhack, C., Ben-Ari, G., Pector, J.C. and Lejeune, F.J. (1996). Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann Surg* **224 (6)**, 756-64; discussion 764-5
- [57] Eggermont, A.M., Schraffordt Koops, H., Klausner, J.M., Lienard, D., Kroon, B.B., Schlag, P.M., Ben-Ari, G. and Lejeune, F.J. (1997). Isolation limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and chemotherapy for advanced extremity soft tissue sarcomas. *Semin Oncol* **24 (5)**, 547-55
- [58] Eggert, A., Grotzer, M.A., Zuzak, T.J., Wiewrodt, B.R., Ho, R., Ikegaki, N. and 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)**, 1314-9
- [59] Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C. and Young, P.R. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **273 (23)**, 14363-7
- [60] Escarcega, R.O., Fuentes-Alexandro, S., Garcia-Carrasco, M., Gatica, A. and Zamora, A. (2007). The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19 (2)**, 154-61
- [61] Evdokiou, A., Bouralexis, S., Atkins, G.J., Chai, F., Hay, S., Clayer, M. and Findlay, D.M. (2002). Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* **99 (4)**, 491-504

- [62] Fishel, M.L., Rabik, C.A., Bleibel, W.K., Li, X., Moschel, R.C. and Dolan, M.E. (2006). Role of GADD34 in modulation of cisplatin cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* **71** (3), 239-47
- [63] Fulda, S., Meyer, E. and Debatin, K.M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **21** (15), 2283-94
- [64] Gazitt, Y., Shaughnessy, P. and Montgomery, W. (1999). Apoptosis-induced by TRAIL AND TNF-alpha in human multiple myeloma cells is not blocked by BCL-2. *Cytokine* **11** (12), 1010-9
- [65] Gehrman, M. (2006). Drug evaluation: STA-4783--enhancing taxane efficacy by induction of Hsp70. *Curr Opin Investig Drugs* **7** (6), 574-80
- [66] Gong, B. and Almasan, A. (2000). Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Biochem Biophys Res Commun* **278** (3), 747-52
- [67] Gonzalez, M.V., Jimenez, B., Berciano, M.T., Gonzalez-Sancho, J.M., Caelles, C., Lafarga, M. and Munoz, A. (2000). Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol* **150** (5), 1199-208
- [68] Gorman, S.P., McCafferty, D.F., Woolfson, A.D. and Jones, D.S. (1987). Reduced adherence of micro-organisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent. *J Appl Bacteriol* **62** (4), 315-20
- [69] Gorman, S.P., McCafferty DF, Woolfson AD, Jones DS (1987). Electron microscope observations of bacterial surface effects due to taurolidine treatment. *Lett Appl Microbiol* **4**, 103-109
- [70] Gortzak, E., Azzarelli, A., Buesa, J., Bramwell, V.H., van Coevorden, F., van Geel, A.N., Ezzat, A., Santoro, A., Oosterhuis, J.W., van Glabbeke, M., Kirkpatrick, A. and Verweij, J. (2001). A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for 'high-risk' adult soft-tissue sarcoma. *Eur J Cancer* **37** (9), 1096-103
- [71] Green, D.R. and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281** (5381), 1309-12
- [72] Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H. and Kubin, M.Z. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* **161** (6), 2833-40
- [73] Griffith, T.S. and Lynch, D.H. (1998). TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* **10** (5), 559-63

- [74] Grimer, R., Judson, I., Peake, D. and Seddon, B. (2010). Guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Sarcoma* **2010**, 506182
- [75] Guo, L.L., Xiao, S. and Guo, Y. (2005). Activation of transcription factors NF-kappaB and AP-1 and their relations with apoptosis associated-proteins in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **11 (25)**, 3860-5
- [76] Gura, T. (1997). How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* **277 (5327)**, 768
- [77] Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249 (4969)**, 635-40
- [78] Han, Z., Ribbizi, I., Pantazis, P., Wyche, J., Darnowski, J. and Calabresi, P. (2002). The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism. *Anticancer Res* **22 (4)**, 1959-64
- [79] Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P. and Baldwin, A.S., Jr. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* **65 (7)**, 1281-9
- [80] Heyninck, K., Denecker, G., De Valck, D., Fiers, W. and Beyaert, R. (1999). Inhibition of tumor necrosis factor-induced necrotic cell death by the zinc finger protein A20. *Anticancer Res* **19 (4B)**, 2863-8
- [81] Hoffmann, A., Leung, T.H. and Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J* **22 (20)**, 5530-9
- [82] Hoffmann, A., Natoli, G. and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25 (51)**, 6706-16
- [83] Hohenberger, P., Haier, J., Kettelhack, C., Schulze, G. and Schlag, P.M. (1997). Assessment of regional and systemic toxicity of isolated hyperthermic extremity perfusion with tumor necrosis factor-alpha and melphalan. *Chirurg* **68 (9)**, 914-20
- [84] Hollander, M.C., Zhan, Q., Bae, I. and Fornace, A.J., Jr. (1997). Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem* **272 (21)**, 13731-7
- [85] Hotta, T., Suzuki, H., Nagai, S., Yamamoto, K., Imakiire, A., Takada, E., Itoh, M. and Mizuguchi, J. (2003). Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-

inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J Orthop Res* **21** (5), 949-57

- [86] Hsu, J.Y. and Wakelee, H.A. (2009). Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy. *BioDrugs* **23** (5), 289-304
- [87] Hu, Q., Zhou, M.X., Liu, S.Y., Zhang, L.Q., Liu, A.Q., Guo, Y.J. and Song, Y. (2003). Regulation of NF-kappaB/P65 by MDM2 in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **41** (12), 921-4
- [88] Hu, W.H., Johnson, H. and Shu, H.B. (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* **274** (43), 30603-10
- [89] Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A. and de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* **4** (4), 563-71
- [90] Issels, R.D., Abdel-Rahman, S., Wendtner, C., Falk, M.H., Kurze, V., Sauer, H., Aydemir, U. and Hiddemann, W. (2001). Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur J Cancer* **37** (13), 1599-608
- [91] Jacobi, C.A., Ordemann, J., Bohm, B., Zieren, H.U., Sabat, R. and Muller, J.M. (1997). Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation in laparoscopic surgery in a rat model. *Am J Surg* **174** (3), 359-63
- [92] Jacobi, C.A., Menenakos, C. and Braumann, C. (2005). Taurolidine--a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs* **16** (9), 917-21
- [93] Jain, A., Sajeevan, K.V., Babu, K.G. and Lakshmaiah, K.C. (2009). Chemotherapy in adult soft tissue sarcoma. *Indian J Cancer* **46** (4), 274-87
- [94] Javelaud, D. and Besancon, F. (2001). NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B. *Oncogene* **20** (32), 4365-72
- [95] Jin, Z. and El-Deiry, W.S. (2006). Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **26** (21), 8136-48

- [96] Jo, M., Kim, T.H., Seol, D.W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R. and Strom, S.C. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* **6** (5), 564-7
- [97] Kappler, R., Bauer, R., Calzada-Wack, J., Rosemann, M., Hemmerlein, B. and Hahn, H. (2004). Profiling the molecular difference between Patched- and p53-dependent rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **23** (54), 8785-95
- [98] Karacay, B., Sanlioglu, S., Griffith, T.S., Sandler, A. and Bonthius, D.J. (2004). Inhibition of the NF-kappaB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther* **11** (10), 681-90
- [99] Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63
- [100] Karin, M. and Chang, L. (2001). AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol* **169** (3), 447-51
- [101] Kasper, B., Scharrenbroich, I., Schmitt, T., Wuchter, P., Dietrich, S., Ho, A.D. and Egerer, G. (2009). Consolidation with high-dose chemotherapy and stem cell support for responding patients with metastatic soft tissue sarcomas: prospective, single-institutional phase II study. *Bone Marrow Transplant* **45** (7), 1234-8
- [102] Kasuga, C., Ebata, T., Kayagaki, N., Yagita, H., Hishii, M., Arai, H., Sato, K. and Okumura, K. (2004). Sensitization of human glioblastomas to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by NF-kappaB inhibitors. *Cancer Sci* **95** (10), 840-4
- [103] Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Nau, M.M., Russell, E.K. and Lipkowitz, S. (1999). Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* **59** (3), 734-41
- [104] Keane, M.M., Rubinstein, Y., Cuello, M., Ettenberg, S.A., Banerjee, P., Nau, M.M. and Lipkowitz, S. (2000). Inhibition of NF-kappaB activity enhances TRAIL mediated apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* **64** (2), 211-9
- [105] Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26** (4), 239-57
- [106] Kerr, J.F., Winterford, C.M. and Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73** (8), 2013-26

- [107] Kilic, M., Kasperczyk, H., Fulda, S. and Debatin, K.M. (2007). Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* **26** (14), 2027-38
- [108] Kim, S.H., Kim, K., Kwagh, J.G., Dicker, D.T., Herlyn, M., Rustgi, A.K., Chen, Y. and El-Deiry, W.S. (2004). Death induction by recombinant native TRAIL and its prevention by a caspase 9 inhibitor in primary human esophageal epithelial cells. *J Biol Chem* **279** (38), 40044-52
- [109] Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J. and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12** (6), 611-20
- [110] Kluttermann, K., Banning, U., Kachel, M., Krause, C., Korholz, D. and Mauz-Korholz, C. (2006). TRAIL-induced cytotoxicity in a melphalan-resistant rhabdomyosarcoma cell line via activation of caspase-2. *Anticancer Res* **26** (1A), 351-6
- [111] Krieg, A., Krieg, T., Wenzel, M., Schmitt, M., Ramp, U., Fang, B., Gabbert, H.E., Gerharz, C.D. and Mahotka, C. (2003). TRAIL-beta and TRAIL-gamma: two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential. *Br J Cancer* **88** (6), 918-27
- [112] Kuhnen, C., Langer, S., Jabaly, D., Müller, K.-M. and Steinau, H.U. (2002). Weichgewebssarkome: Ergebnisse des operativen Referenzzentrums und Registers für Gliedmaßen-tumoren/Weichgewebstumorregisters Bochum an 1008 Tumoren. (Zugriff vom: 12.09.2010).
<http://www.bergmannsheil.de/fileadmin/ausbildung/poster/files/296.pdf>
- [113] Kurland, J.F., Kodym, R., Story, M.D., Spurgers, K.B., McDonnell, T.J. and Meyn, R.E. (2001). NF-kappaB1 (p50) homodimers contribute to transcription of the bcl-2 oncogene. *J Biol Chem* **276** (48), 45380-6
- [114] Lauricella, M., Emanuele, S., D'Anneo, A., Calvaruso, G., Vassallo, B., Carlisi, D., Portanova, P., Vento, R. and Tesoriere, G. (2006). JNK and AP-1 mediate apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cells via FasL/caspase-8 and mitochondria-dependent pathways. *Apoptosis* **11** (4), 607-25
- [115] 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.S., Kelley, S., Fox, J.A., Thomas, D. and Ashkenazi, A. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* **7** (4), 383-5

- [116] Leaman, D.W., Chawla-Sarkar, M., Vyas, K., Reheman, M., Tamai, K., Toji, S. and Borden, E.C. (2002). Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277** (32), 28504-11
- [117] LeBlanc, H.N. and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10** (1), 66-75
- [118] Lehnhardt, M., Klein-Hitpass, L., Kuhnen, C., Homann, H.H., Daigeler, A., Steinau, H.U., Roehrs, S., Schnoor, L., Steintraesser, L. and Mueller, O. (2005). Response rate of fibrosarcoma cells to cytotoxic drugs on the expression level correlates to the therapeutic response rate of fibrosarcomas and is mediated by regulation of apoptotic pathways. *BMC Cancer* **5**, 74
- [119] Leithauser, M.L., Rob, P.M. and Sack, K. (1997). Pentoxifylline, cyclosporine A and taurolidine inhibit endotoxin-stimulated tumor necrosis factor-alpha production in rat mesangial cell cultures. *Exp Nephrol* **5** (1), 100-4
- [120] Lejeune, F.J. and Rugg, C. (2006). Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer* **93** (8), E90-100
- [121] Lorigan, P., Verweij, J., Papai, Z., Rodenhuis, S., Le Cesne, A., Leahy, M.G., Radford, J.A., Van Glabbeke, M.M., Kirkpatrick, A., Hogendoorn, P.C. and Blay, J.Y. (2007). Phase III trial of two investigational schedules of ifosfamide compared with standard-dose doxorubicin in advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol* **25** (21), 3144-50
- [122] Lu, G., Janjic, B.M., Janjic, J., Whiteside, T.L., Storkus, W.J. and Vujanovic, N.L. (2002). Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Immunol* **168** (4), 1831-9
- [123] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94** (4), 481-90
- [124] Marcinkiewicz, J., Kurnyta, M., Biedron, R., Bobek, M., Kontny, E. and Maslinski, W. (2006). Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **583**, 481-92

- [125] Mariani, S.M. and Krammer, P.H. (1998). Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* **28 (5)**, 1492-8
- [126] Matta, H. and Chaudhary, P.M. (2005). The proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) inhibits growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma cells. *Cancer Biol Ther* **4 (1)**, 77-82
- [127] McCartney, A.C. and Browne, M.K. (1988). Clinical studies on administration of taurodin in severe sepsis: a preliminary study. *Prog Clin Biol Res* **272**, 361-71
- [128] McCourt, M., Wang, J.H., Sookhai, S. and Redmond, H.P. (2000). Taurodin inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol* **7 (9)**, 685-91
- [129] Mikami, T., Koyama, T., Imakiire, A., Yamamoto, K., Furuhata, M., Toyota, H. and Mizuguchi, J. (2006). C-jun N-terminal kinase activation is required for apoptotic cell death induced by TNF-related apoptosis-inducing ligand plus DNA-damaging agents in sarcoma cell lines. *Anticancer Res* **26 (2A)**, 1153-60
- [130] Mitsiades, C.S., Treon, S.P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T. and Anderson, K.C. (2001). TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* **98 (3)**, 795-804
- [131] Mitsiades, N., Poulaki, V., Mitsiades, C. and 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 (6)**, 2704-12
- [132] Mizutani, Y., Yoshida, O., Miki, T. and Bonavida, B. (1999). Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* **5 (9)**, 2605-12
- [133] Mongkolsapaya, J., Grimes, J.M., Chen, N., Xu, X.N., Stuart, D.I., Jones, E.Y. and Scredon, G.R. (1999). Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol* **6 (11)**, 1048-53
- [134] Monson, J.R., Ramsey, P.S. and Donohue, J.H. (1993). Taurodin inhibits tumour necrosis factor (TNF) toxicity--new evidence of TNF and endotoxin synergy. *Eur J Surg Oncol* **19 (3)**, 226-31
- [135] Muhlenbeck, F., Haas, E., Schwenzer, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P. and Wajant, H. (1998). TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* **273 (49)**, 33091-8

- [136] Muhlenbeck, F., Schneider, P., Bodmer, J.L., Schwenzler, R., Hauser, A., Schubert, G., Scheurich, P., Moosmayer, D., Tschopp, J. and 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), 32208-13
- [137] Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273** (5), 2926-30
- [138] Nagane, M., Huang, H.J. and Cavenee, W.K. (2001). The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* **6** (3), 191-7
- [139] Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256** (1), 12-8
- [140] Nakano, T., Tani, M., Ishibashi, Y., Kimura, K., Park, Y.B., Imaizumi, N., Tsuda, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Ohwada, S. and Yokota, J. (2003). Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis* **20** (7), 665-74
- [141] Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y. and Yamori, T. (2005). Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther* **4** (3), 399-412
- [142] Nestler, G., Schulz, H.U., Schubert, D., Kruger, S., Lippert, H. and Pross, M. (2005). Impact of taurolidine on the growth of CC531 coloncarcinoma cells in vitro and in a laparoscopic animal model in rats. *Surg Endosc* **19** (2), 280-4
- [143] Nici, L., Monfils, B. and Calabresi, P. (2004). The effects of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* **10** (22), 7655-61
- [144] Nielsen, O.S., Dombernowsky, P., Mouridsen, H., Crowther, D., Verweij, J., Buesa, J., Steward, W., Daugaard, S., van Glabbeke, M., Kirkpatrick, A. and Tursz, T. (1998). High-dose epirubicin is not an alternative to standard-dose doxorubicin in the treatment of advanced soft tissue sarcomas. A study of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. *Br J Cancer* **78** (12), 1634-9
- [145] Nomura, T., Yamasaki, M., Nomura, Y. and Mimata, H. (2005). Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep* **14** (4), 993-7

- [146] Norum, O.J., Giercksky, K.E. and Berg, K. (2009). Photochemical internalization as an adjunct to marginal surgery in a human sarcoma model. *Photochem Photobiol Sci* **8 (6)**, 758-62
- [147] O'Connor, J.M., Chacon, M., Petracchi, F.E. and Chacon, R.D. (2008). Adjuvant chemotherapy in soft tissue sarcoma (STS): A meta-analysis of published data. *ASCO Meeting Abstracts* **26 (Suppl 15)**, 10526
- [148] O'Dea, E. and Hoffmann, A. (2009). NF-kappaB signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **1 (1)**, 107
- [149] O'Dea, E. and Hoffmann, A. (2010). The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2 (1)**, a000216
- [150] O'Sullivan, B., Davis, A.M., Turcotte, R., Bell, R., Catton, C., Chabot, P., Wunder, J., Kandel, R., Goddard, K., Sadura, A., Pater, J. and Zee, B. (2002). Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet* **359 (9325)**, 2235-41
- [151] Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364 (6440)**, 806-9
- [152] Opitz, I., Sigrist, B., Hillinger, S., Lardinois, D., Stahel, R., Weder, W. and Hopkins-Donaldson, S. (2007). Taurolidine and povidone-iodine induce different types of cell death in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **56 (3)**, 327-36
- [153] Ota, T., Maeda, M., Suto, S. and Tatsuka, M. (2004). LyGDI functions in cancer metastasis by anchoring Rho proteins to the cell membrane. *Mol Carcinog* **39 (4)**, 206-20
- [154] Ozoren, N., Kim, K., Burns, T.F., Dicker, D.T., Moscioni, A.D. and El-Deiry, W.S. (2000). The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* **60 (22)**, 6259-65
- [155] Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R. and Dixit, V.M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277 (5327)**, 815-8
- [156] Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. and Dixit, V.M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276 (5309)**, 111-3

- [157] Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D.U., Pham, C.G., Nelsbach, A.H., Melis, T., De Smaele, E., Tang, W.J., D'Adamio, L. and Franzoso, G. (2004). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* **6** (2), 146-53
- [158] Park, B.C., Thapa, D., Lee, Y.S., Kwak, M.K., Lee, E.S., Choi, H.G., Yong, C.S. and Kim, J.A. (2007). 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone inhibits the invasion and migration of HT1080 human fibrosarcoma cells through the inhibition of proMMP-2 activation and down regulation of MMP-9 and MT1-MMP. *Eur J Pharmacol* **567** (3), 193-7
- [159] Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Hong, J.Y., Kim, W.B., Kim, S.H. and Lee, S.K. (2005). Inhibitory effect of DA-125, a new anthracyclin analog antitumor agent, on the invasion of human fibrosarcoma cells by down-regulating the matrix metalloproteinases. *Biochem Pharmacol* **71** (1-2), 21-31
- [160] Park, J.M., Kim, A., Oh, J.H. and Chung, A.S. (2007). Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis* **28** (4), 837-47
- [161] Park, S.M., Schickel, R. and Peter, M.E. (2005). Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* **17** (6), 610-6
- [162] Park, S.Y., Billiar, T.R. and Seol, D.W. (2002). IFN-gamma inhibition of TRAIL-induced IAP-2 upregulation, a possible mechanism of IFN-gamma-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **291** (2), 233-6
- [163] Pervaiz, N., Colterjohn, N., Farrokhyar, F., Tozer, R., Figueredo, A. and Ghert, M. (2008). A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. *Cancer* **113** (3), 573-81
- [164] Pfirmann, R.W. (1991). Taurolidin in der Anwendung bei chirurgischen Infektionen. *Chir Gastroenterol* **6**, 131-142
- [165] Pisters, P.W., Patel, S.R., Prieto, V.G., Thall, P.F., Lewis, V.O., Feig, B.W., Hunt, K.K., Yasko, A.W., Lin, P.P., Jacobson, M.G., Burgess, M.A., Pollock, R.E., Zagars, G.K., Benjamin, R.S. and Ballo, M.T. (2004). Phase I trial of preoperative doxorubicin-based concurrent chemoradiation and surgical resection for localized extremity and body wall soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* **22** (16), 3375-80
- [166] Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A. and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new

member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271** (22), 12687-90

- [167] Piva, R., Gianferretti, P., Ciucci, A., Taulli, R., Belardo, G. and Santoro, M.G. (2005). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* **105** (4), 1750-8
- [168] Pizzi, M., Goffi, F., Boroni, F., Benarese, M., Perkins, S.E., Liou, H.C. and Spano, P. (2002). Opposing roles for NF-kappa B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1beta. *J Biol Chem* **277** (23), 20717-23
- [169] Pollack, I.F., Erff, M. and Ashkenazi, A. (2001). Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin Cancer Res* **7** (5), 1362-9
- [170] Proskuryakov, S.Y. and Gabai, V.L. (2010). Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des* **16** (1), 56-68
- [171] Qin, J.Z., Bacon, P., Chaturvedi, V. and Nickoloff, B.J. (2001). Role of NF-kappaB activity in apoptotic response of keratinocytes mediated by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Invest Dermatol* **117** (4), 898-907
- [172] Rajapakse, N., Kim, M.M., Mendis, E., Huang, R. and Kim, S.K. (2006). Carboxylated chitooligosaccharides (CCOS) inhibit MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells via down-regulation of AP-1. *Biochim Biophys Acta* **1760** (12), 1780-8
- [173] Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33** (4), 1027-33
- [174] Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E.J. and Bedi, A. (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* **3** (4), 409-16
- [175] Rayet, B. and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18** (49), 6938-47
- [176] Ren, W., Korchin, B., Zhu, Q.S., Wei, C., Dicker, A., Heymach, J., Lazar, A., Pollock, R.E. and Lev, D. (2008). Epidermal growth factor receptor blockade in combination with conventional chemotherapy inhibits soft tissue sarcoma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **14** (9), 2785-95

- [177] Ren, W., Korchin, B., Lahat, G., Wei, C., Bolshakov, S., Nguyen, T., Merritt, W., Dicker, A., Lazar, A., Sood, A., Pollock, R.E. and Lev, D. (2008). Combined vascular endothelial growth factor receptor/epidermal growth factor receptor blockade with chemotherapy for treatment of local, uterine, and metastatic soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* **14** (17), 5466-75
- [178] Ribizzi, I., Darnowski, J.W., Goulette, F.A., Akhtar, M.S., Chatterjee, D. and Calabresi, P. (2002). Taurolidine: preclinical evaluation of a novel, highly selective, agent for bone marrow purging. *Bone Marrow Transplant* **29** (4), 313-9
- [179] Rieger, J., Naumann, U., Glaser, T., Ashkenazi, A. and Weller, M. (1998). APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS Lett* **427** (1), 124-8
- [180] Rodak, R., Kubota, H., Ishihara, H., Eugster, H.P., Konu, D., Mohler, H., Yonekawa, Y. and Frei, K. (2005). Induction of reactive oxygen intermediates-dependent programmed cell death in human malignant ex vivo glioma cells and inhibition of the vascular endothelial growth factor production by taurolidine. *J Neurosurg* **102** (6), 1055-68
- [181] Rong, S., Jeffers, M., Resau, J.H., Tsarfaty, I., Oskarsson, M. and Vande Woude, G.F. (1993). Met expression and sarcoma tumorigenicity. *Cancer Res* **53** (22), 5355-60
- [182] Roth, W., Isenmann, S., Naumann, U., Kugler, S., Bahr, M., Dichgans, J., Ashkenazi, A. and Weller, M. (1999). Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **265** (2), 479-83
- [183] Sah, N.K., Munshi, A., Kurland, J.F., McDonnell, T.J., Su, B. and Meyn, R.E. (2003). Translation inhibitors sensitize prostate cancer cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **278** (23), 20593-602
- [184] Sanceau, J., Hiscott, J., Delattre, O. and Wietzerbin, J. (2000). IFN-beta 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** (30), 3372-83
- [185] Sanceau, J., Boyd, D.D., Seiki, M. and Bauvois, B. (2002). Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem* **277** (38), 35766-75

- [186] Sanchez-Valdepenas, C., Martin, A.G., Ramakrishnan, P., Wallach, D. and Fresno, M. (2006). NF-kappaB-inducing kinase is involved in the activation of the CD28 responsive element through phosphorylation of c-Rel and regulation of its transactivating activity. *J Immunol* **176** (8), 4666-74
- [187] Santoro, A., Tursz, T., Mouridsen, H., Verweij, J., Steward, W., Somers, R., Buesa, J., Casali, P., Spooner, D. and Rankin, E. (1995). Doxorubicin versus CYVADIC versus doxorubicin plus ifosfamide in first-line treatment of advanced soft tissue sarcomas: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *J Clin Oncol* **13** (7), 1537-45
- [188] Sarkar, D., Su, Z.Z., Lebedeva, I.V., Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Valerie, K., Dent, P. and Fisher, P.B. (2002). mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (15), 10054-9
- [189] Sarnico, I., Lanzillotta, A., Benarese, M., Alghisi, M., Baiguera, C., Battistin, L., Spano, P. and Pizzi, M. (2009). NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. *Int Rev Neurobiol* **85**, 351-62
- [190] Sauer, R., Schuchardt, U., Hohenberger, W., Wittekind, C., Papadopoulos, T., Grabenbauer, G.G. and Fietkau, R. (1999). Neoadjuvant radiochemotherapy in soft tissue sarcomas. Optimization of local functional tumor control. *Strahlenther Onkol* **175** (6), 259-66
- [191] Savill, J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* **53** (3), 491-508
- [192] Schlemmer, M., Wendtner, C.M., Lindner, L., Abdel-Rahman, S., Hiddemann, W. and Issels, R.D. (2010). Thermochemotherapy in patients with extremity high-risk soft tissue sarcomas (HR-STs). *Int J Hyperthermia* **26** (2), 127-35
- [193] Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N. and Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* **7** (6), 831-6
- [194] Schuller-Levis, G.B. and Park, E. (2003). Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* **226** (2), 195-202
- [195] Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293** (5534), 1495-9

- [196] Sgonc, R. and Wick, G. (1994). Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* **105** (4), 327-32
- [197] Shankar, S.L., O'Guin, K., Kim, M., Varnum, B., Lemke, G., Brosnan, C.F. and Shafit-Zagardo, B. (2006). Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Neurosci* **26** (21), 5638-48
- [198] 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. and Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277** (5327), 818-21
- [199] Shifera, A.S., Friedman, J.M. and Horwitz, M.S. (2008). IKK gamma (NEMO) is involved in the coordination of the AP-1 and NF-kappa B pathways. *Mol Cell Biochem* **310** (1-2), 181-90
- [200] Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H. and Kim, K. (2005). Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J* **24** (20), 3532-42
- [201] Shryer, D.P., Lukoff, H., King, T. and Calabresi, P. (2003). The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells. *Anticancer Drugs* **14** (4), 295-303
- [202] Shukla, S. and Gupta, S. (2004). Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res* **10** (9), 3169-78
- [203] Singer, S., Corson, J.M., Demetri, G.D., Healey, E.A., Marcus, K. and Eberlein, T.J. (1995). Prognostic factors predictive of survival for truncal and retroperitoneal soft-tissue sarcoma. *Ann Surg* **221** (2), 185-95
- [204] Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266** (5189), 1376-80
- [205] Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H. and 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** (6), 599-609

- [206] Spriggs, D.R., Sherman, M.L., Frei, E., 3rd and Kufe, D.W. (1987). Clinical studies with tumour necrosis factor. *Ciba Found Symp* **131**, 206-27
- [207] Staubach, K.H. (1997). Adjuvant therapy of peritonitis with taurolidine. Modulation of mediator liberation. *Langenbecks Arch Chir* **382 (4 Suppl 1)**, 26-30
- [208] Stein, B., Baldwin, A.S., Jr., Ballard, D.W., Greene, W.C., Angel, P. and Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* **12 (10)**, 3879-91
- [209] Steinbach-Lebbin, C., Ganz, A.J., Chang, A. and Waser, P.G. (1982). Pharmacokinetics of Taurolin. *Arzneimittelforschung* **32 (12)**, 1542-6
- [210] Stendel, R., Scheurer, L., Stoltenburg-Didinger, G., Brock, M. and Mohler, H. (2003). Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine. *Anticancer Res* **23 (3B)**, 2309-14
- [211] Stendel, R., Picht, T., Schilling, A., Heidenreich, J., Loddenkemper, C., Janisch, W. and Brock, M. (2004). Treatment of glioblastoma with intravenous taurolidine. First clinical experience. *Anticancer Res* **24 (2C)**, 1143-7
- [212] Stendel, R., Scheurer, L., Schlatterer, K., Stalder, U., Pfirmann, R.W., Fiss, I., Mohler, H. and Bigler, L. (2007). Pharmacokinetics of taurolidine following repeated intravenous infusions measured by HPLC-ESI-MS/MS of the derivatives taurultame and taurinamide in glioblastoma patients. *Clin Pharmacokinet* **46 (6)**, 513-24
- [213] Takahashi, M., Shimizu, T., Moriizumi, E. and Shirasawa, T. (2008). Clk-1 deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mech Ageing Dev* **129 (5)**, 291-8
- [214] Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H. and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* **195 (2)**, 161-9
- [215] Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T.W., Taki, S. and Taniguchi, T. (1995). An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature* **376 (6541)**, 596-9
- [216] Taulli, R., Scuoppo, C., Bersani, F., Accornero, P., Forni, P.E., Miretti, S., Grinza, A., Allegra, P., Schmitt-Ney, M., Crepaldi, T. and Ponzetto, C. (2006). Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* **66 (9)**, 4742-9

- [217] Taylor, A.C., Schuster, K., McKenzie, P.P. and Harris, L.C. (2006). Differential cooperation of oncogenes with p53 and Bax to induce apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer* **5**, 53
- [218] Tergaonkar, V. (2006). NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* **38 (10)**, 1647-53
- [219] Thallinger, C., Wolschek, M.F., Maierhofer, H., Skvara, H., Pehamberger, H., Monia, B.P., Jansen, B., Wacheck, V. and Selzer, E. (2004). Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* **10 (12 Pt 1)**, 4185-91
- [220] Tierney, J. (1997). Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. Sarcoma Meta-analysis Collaboration. *Lancet* **350 (9092)**, 1647-54
- [221] Toma, S., Canavese, G., Grimaldi, A., Ravera, G., Ugolini, D., Percivale, P. and Badellino, F. (2003). Concomitant chemoradiotherapy in the treatment of locally advanced and/or metastatic soft tissue sarcomas: experience of the National Cancer Institute of Genoa. *Oncol Rep* **10 (3)**, 641-7
- [222] Tomek, S., Koestler, W., Horak, P., Grunt, T., Brodowicz, T., Pribill, I., Halaschek, J., Haller, G., Wiltschke, C., Zielinski, C.C. and Krainer, M. (2003). Trail-induced apoptosis and interaction with cytotoxic agents in soft tissue sarcoma cell lines. *Eur J Cancer* **39 (9)**, 1318-29
- [223] Tsai, W.S., Yeow, W.S., Chua, A., Reddy, R.M., Nguyen, D.M. and Schrupp, D.S. (2006). Enhancement of Apo2L/TRAIL-mediated cytotoxicity in esophageal cancer cells by cisplatin. *Mol Cancer Ther* **5 (12)**, 2977-90
- [224] Varfolomeev, E. and Vucic, D. (2008). (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways. *Cell Cycle* **7 (11)**, 1511-21
- [225] Verhoef, C., de Wilt, J.H., Grunhagen, D.J., van Geel, A.N., ten Hagen, T.L. and Eggermont, A.M. (2007). Isolated limb perfusion with melphalan and TNF-alpha in the treatment of extremity sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* **8 (6)**, 417-27
- [226] Verma, S., Younus, J., Stys-Norman, D., Haynes, A.E. and Blackstein, M. (2008). Meta-analysis of ifosfamide-based combination chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma. *Cancer Treat Rev* **34 (4)**, 339-47

- [227] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184** (1), 39-51
- [228] Vidalain, P.O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C. and Servet-Delprat, C. (2000). Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol* **74** (1), 556-9
- [229] Vogt, A., McDonald, P.R., Tamewitz, A., Sikorski, R.P., Wipf, P., Skoko, J.J., 3rd and Lazo, J.S. (2008). A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells. *Mol Cancer Ther* **7** (2), 330-40
- [230] Vrouwenraets, B.C., Eggermont, A.M., Hart, A.A., Klaase, J.M., van Geel, A.N., Nieweg, O.E. and Kroon, B.B. (2001). Regional toxicity after isolated limb perfusion with melphalan and tumour necrosis factor- alpha versus toxicity after melphalan alone. *Eur J Surg Oncol* **27** (4), 390-5
- [231] 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. and Rauch, C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* **16** (17), 5386-97
- [232] Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C. and Lynch, D.H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* **5** (2), 157-63
- [233] Walczak, H., Ganten, T., Große-Wilde, A., Koschny, R., Sagulenko, E., Sykora, J., Weigand, M., Haas, T., Sprick, M., Schader, M., Willen, D., Lucas, M., Buffy, V., Pfeifer, D., Rappl, C., Stahl, H., Moos, B., Leonard, C., Aravena, E. and Hernández Casana, P. (2004). Apoptose-Regulation. in: *Wissenschaftlicher Ergebnisbericht 2002-2003*. DKFZ, Heidelberg, 238-242
- [234] Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. and Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**, 331-67
- [235] Walters, D.K., Muff, R., Langsam, B., Gruber, P., Born, W. and Fuchs, B. (2007). Taurolidine: a novel anti-neoplastic agent induces apoptosis of osteosarcoma cell lines. *Invest New Drugs* **25** (4), 305-12

- [236] Wang, C.Y., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* **274 (5288)**, 784-7
- [237] Wang, H.W., Rickter, E., Yuan, M., Wileyto, E.P., Glatstein, E., Yodh, A. and Busch, T.M. (2007). Effect of photosensitizer dose on fluence rate responses to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **83 (5)**, 1040-8
- [238] Weber, T., Lu, M., Andera, L., Lahm, H., Gellert, N., Fariss, M.W., Korinek, V., Sattler, W., Ucker, D.S., Terman, A., Schroder, A., Erl, W., Brunk, U.T., Coffey, R.J., Weber, C. and Neuzil, J. (2002). Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clin Cancer Res* **8 (3)**, 863-9
- [239] Weiss, S.W., Goldblum, J.R., Enzinger, F.M. (2001). *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. 4th ed, Mosby
- [240] Wendtner, C., Abdel-Rahman, S., Baumert, J., Falk, M.H., Krych, M., Santl, M., Hiddemann, W. and Issels, R.D. (2001). Treatment of primary, recurrent or inadequately resected high-risk soft-tissue sarcomas (STS) of adults: results of a phase II pilot study (RHT-95) of neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia. *Eur J Cancer* **37 (13)**, 1609-16
- [241] Widmann, C., Johnson, N.L., Gardner, A.M., Smith, R.J. and Johnson, G.L. (1997). Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene* **15 (20)**, 2439-47
- [242] 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. and Smith, C.A. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3 (6)**, 673-82
- [243] Willatts, S.M., Radford, S. and Leitermann, M. (1995). Effect of the antiendotoxic agent, taurolidine, in the treatment of sepsis syndrome: a placebo-controlled, double-blind trial. *Crit Care Med* **23 (6)**, 1033-9
- [244] Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306
- [245] Ying, H., Biroc, S.L., Li, W.W., Alicke, B., Xuan, J.A., Pagila, R., Ohashi, Y., Okada, T., Kamata, Y. and Dinter, H. (2006). The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther* **5 (9)**, 2158-64
- [246] Yoshida, S., Narita, T., Koshida, S., Ohta, S. and Takeuchi, Y. (2003). TRAIL/Apo2L ligands induce apoptosis in malignant rhabdoid tumor cell lines. *Pediatr Res* **54 (5)**, 709-17

- [247] Yu, K., Ravera, C.P., Chen, Y.N. and McMahon, G. (1997). Regulation of Myc-dependent apoptosis by p53, c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases, and Mdm-2. *Cell Growth Differ* **8 (7)**, 731-42
- [248] Zarnegar, B., Yamazaki, S., He, J.Q. and Cheng, G. (2008). Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105 (9)**, 3503-8
- [249] Zhang, L., Cui, R., Cheng, X. and Du, J. (2005). Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{kappa}B kinase. *Cancer Res* **65 (2)**, 457-64
- [250] Zhang, L., Cui, R., Cheng, X. and Du, J. (2005). Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating IkappaB kinase. *Cancer Res* **65 (2)**, 457-64
- [251] Zhang, X.D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T. and Hersey, P. (1999). Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* **59 (11)**, 2747-53
- [252] Zhang, X.D., Franco, A.V., Nguyen, T., Gray, C.P. and Hersey, P. (2000). Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* **164 (8)**, 3961-70
- [253] Zhang, X.D., Zhang, X.Y., Gray, C.P., Nguyen, T. and Hersey, P. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res* **61 (19)**, 7339-48
- [254] Zhu, Q.S., Ren, W., Korchin, B., Lahat, G., Dicker, A., Lu, Y., Mills, G., Pollock, R.E. and Lev, D. (2008). Soft tissue sarcoma cells are highly sensitive to AKT blockade: a role for p53-independent up-regulation of GADD45 alpha. *Cancer Res* **68 (8)**, 2895-903

Anhang

Tabellen

Tab. A1: Weichteilsarkome, Stadieneinteilung nach TNM 2002

TNM-Stadium	Ausdehnung/Befall
T1	≤ 5cm
T1a	oberflächlich ¹⁾
T1b	tief ²⁾
T2	> 5cm
T2a	oberflächlich ¹⁾
T2b	tief ²⁾
N1	regionäre LK
M1	Fernmetastasen

Legende:

1) „oberflächlich“ = vollständig oberhalb der oberflächlichen Faszie

2) „tief“ = nicht „oberflächliche“ und innerhalb von Thorax, Abdomen, Becken oder retroperitoneal gelegene Tumoren

Tab. A2: Weichteilsarkome, Stadieneinteilung nach UICC 2002

UICC-Stadium	TNM
IA	G1 T1 N0 M0
IB	G1 T2 N0 M0
IIA	G2 T1 N0 M0
IIB	G2 T2a N0 M0
IIIA	G2 T2b // G3 T1 N0 M0
IIIB	G3 T2 N0 M0
IIIC	jedes N1 M0
IV	jedes M1

Tab. A3: NFκB, Zielgene und deren Eigenschaften

anti-apoptotische	Zielgene von NFκB	pro-apoptotische
Bcl-2, Bcl-x _L , A1	Bcl-2 Proteine	Bak, Bax
XIAP, cIAPs	inhibitor of apoptosis Proteine	
	Rezeptoren	Fas, TNF-R1, TRAIL-R2
	Liganden	FasL, TRAIL
	Adaptermoleküle	TRAF-1, -2, -6
c-FLIP	Sonstige	Gadd45β, c-Myc p53

Tab. A4: TRAIL, Rezeptoren-System

Rezeptor	Death Domain	Funktion
TRAIL-R1/DR4	intrazellulär [156]	Apoptose-Induktion [108, 117]
TRAIL-R2/DR5	intrazellulär [155, 198, 231]	
DR4 + DR5: beide induzieren Apoptose, agieren aber voneinander unabhängig, jeweils einer ist notwendig aber allein nicht ausreichend zur Apoptoseinduktion; Heterokomplexe sind wahrscheinlich funktionslos [109, 205]		
TRAIL-R3/ DcR1/TRIDD	keine [47, 155-156, 198]	vermutlich Apoptose-Prävention, durch Abfang von Liganden [48, 109, 117, 155, 198]
TRAIL-R4/ DcR2/TRUNDD	trunkiert [48, 109]	
OPG	keine [59]	löslich, niedrig affin [59]

Tab. A5: TRAIL, Eigenschaften und Funktionen

TRAIL – Eigenschaften und Funktionen
<p>Mitglied der TNF-Superfamilie mit Vorkommen in vielen Geweben [166, 242]</p> <p>Geklonnt auf Grundlage der Sequenzhomologie zu Apo1/FasL [75, 109]</p> <p>TypII-Transmembran-Protein [166, 242], proteolytische Spaltung an Zelloberfläche (löslicher Ligand) [125]</p> <p>Homotrimer-Formation (wie TNF), Rezeptor-Clustering (DR5) [89, 133]</p> <p>Cystein-gebundenes Zn-Atom, essentiell für biologische Aktivität [16]</p> <p>Ohne Zn: schlecht löslich mit Tendenz zur Aggregation, d.h. stärker wirksam, toxisch [96, 115]</p>
<p><u>Wirkung:</u></p> <p>Apoptoseinduktion in vielen malignen Zelllinien, NICHT in (den meisten) normalen Geweben [7, 49, 76, 198, 231-232, 242]</p> <p>p53-unabhängige Apoptose in malignen Zellen [117]</p> <p>Xenograft-Modell [64, 72-73, 103, 116, 132, 138, 179, 246, 252]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumorwachstum ↓ [232] - Überleben (Träger) ↑ [7] - Apoptose ↑ [6-7, 130, 169, 182, 232]

<p>Synergismus im Xenograft-Modell [7, 17, 223]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chemo [32] - Radiatio [117] → Sensibilisierung wenig chemosensibler Zellen, Resistenz-Prävention <p>Resensibilisierung (<i>INF</i>) TRAIL-resistenter Zellen [162]</p>
<p><u>Funktionsweise</u> :</p> <p>DISC: TRAIL + FADD, Cas-8 (TRADD, RIP nicht beteiligt) [109, 205]</p> <p>Apoptoseinduktion: extrinsisch getriggert [242] spezifisch über DR [108] aber: in einigen Zellen abhängig vom mitochondrialen Weg (<i>Cas-9-Inhibition</i>) [154]</p> <p>Induzierte Cleavage von Cas-8, -9, -3 [108]</p>
<p><u>Sonstige beteiligte Faktoren</u> :</p> <p>Caspase-10 (kontrovers diskutiert) [117]</p> <ul style="list-style-type: none"> - im DISC nachgewiesen, Apoptose auch ohne Cas-8, aber nachrangig (ggf. nicht-apoptotische Signale) [117] <p>Bcl-2-Familie (kontrovers diskutiert) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bcl-2/Bcl-X_L blockieren Apoptose durch Fas, aber nicht durch TRAIL [108] <p>Bax (essentiell im Kolon-CA u.a.): [117]</p> <ul style="list-style-type: none"> - frühe Events (<i>DISC-Formation, Cas-8-/Bid-Cleavage</i>) → unabhängig - späte Events (<i>Mitochondrien-Depolarisation, Cytochrom-C₁, Cas-9-Aktivierung</i>): → abhängig - Bax-defiziente Zelle => mitochondrialer Weg entscheidend für Apoptoseinduktion - Bax vorhanden => Apoptoseinduktion auch unabhängig vom mitochondrialen Pathway <p>PKCK2-regulierte Pro-Cas-2-Aktivierung (Schlüsselrolle, <i>stress-/DR-mediated apoptosis</i>) [200]</p>
<p><u>TRAIL-Varianten</u>:</p> <p>Alternative splicing: TRAIL-β und -γ [111] Funktion: differenzierte Apoptoseregulation</p> <p>Synthetisch (His-tagged): [108] Hyperoligomerisierung (Hexa-, Nonomere), wirken schneller und stärker, überwinden Schwelle zur Apoptose-Induktion auch in Normalgewebe [117]</p> <p>Synthetisch (ohne exogene Sequenzen): optimal für den klinischen Einsatz [6]</p>

Toxizität:

- i.v. (short-term, hohe Dosen) von Primaten gut vertragen [115]
- i.v. (wiederholt) in Mäusen kein Effekt auf Normalgewebe [7]

Nativ (non-tagged): NICHT toxisch auf

- fast alle Normalgewebe [7, 115]
- humane und Primaten-Hepatozyten [115]
- humane Keratinozyten [171]
- Astrozyten [7, 232]
- Ösophagusepithel [108]

Tagged-Form: toxisch über extrinsischen Pathway [96]

- humane Hepatozyten (toxisch) [96, 115] (*in vitro*)
- Astrozyten (toxisch) [7, 232]
- Keratinozyten (toxisch) [171]
- Ösophagusepithel (toxisch) [108]
- Fibroblasten (NICHT toxisch) [108]

Sensitivität: korreliert mit

- TRAIL-Expression [49]
- Kaspasen-Aktivierung [253]
- Präsenz von Cas-8 [58]
- Smac/DIABLO ↓ (Effektor-Kaspasen insuffizient aktiviert) [117]
- c-FLIP-Level = Inhibition von Cas-8
Korrelation [72-73]
keine Korrelation [200, 253]
- DcR-Überexpression = Apoptose ↓ (evtl. Liganden-Fang) [198]
- DR-Inaktivierung (*nur in wenigen Zelllinien*) [117]
- NFκB-Aktivierung [104]
- p53, NFκB, (MAP)Kinasen u.a. (Mechanismus unklar) [117]
- PKCK2-Aktivität bzw. Pro-Cas-2-Aktivierung [200]
- JNK-Aktivierung [183]

Sonstige Funktionen:

Präventiv gegen Fibrosarkome (Maus) nach Kanzerogengabe (Methylcholantren) [214]

Apoptose (physiologisch) in

- Tumorzellen [122]
 - virusinfizierten Zellen [228]
- } => Immunsurveillance [117]

INF reguliert TRAIL-Expression [66]

Transkriptionsänderung: NFκB-Gene nach 4 Std. induziert [117]

Problematiken:

- TRAIL-Biologie in Maus und Mensch sehr verschieden [117]
- Hepatotoxizität [96, 115]
- Resistenzen [251]

Tab. A6: Taurolidin, Eigenschaften und Funktionen

Eigenschaft
<p><u>Beschreibung:</u> Produkt der AS Taurin, zerfällt in aktive Metabolite (Taurultam, Methyltaurultam), Breitspektrum-Antibiotikum (Bakterien + Fungi) [68-69, 164, 207]</p>
<p>Chemischer Wirkmechanismus: Wechselwirkung → bakterielle Zellwand mit Methylgruppen der aktiven Metaboliten [69, 164]</p>
<p><u>Wirkweise :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Antiadhäsiv auf Bakterien [68-69] - Antiendotoxisch: bindet Endo- und Exotoxine durch Interaktion mit Methylgruppen [11, 119, 134, 164] - Suppression der Zytokin-Produktion (TNFα, IL1β) und -aktivität in : <ul style="list-style-type: none"> - Makrophagen [11] - Mesangiale Zellen (Ratte) [119] - Tumorzellen [27, 210] - Reduktion der TNF-Toxizität [134]
<p><u>Klinische Anwendung :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Peritonitis, SIRS [8, 127, 207] - Postoperative Infektionsprophylaxe [8, 243] - Postoperative Adhäsionsprophylaxe [11, 134] - Kombination mit Antibiotika [14]
<p><u>Antitumor-Wirkung:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Adhäsion / Bodenkontakt ↓ [27, 91, 142, 180, 201, 235] - Metastasenbildung ↓ [41, 91] - Wachstum / Proliferation ↓ [2, 27, 41, 44, 128, 142-143, 152, 178] - Zytotoxizität / Apoptose ↑ [27, 128, 142, 178, 235] - Inhibition der Tumorangio-genese [92, 210] - Kombination mit Heparin [15, 20] - Kombination mit Cisplatin [152] - Einsatz am Menschen [23, 25, 211-212] <p>Fazit: Kombination aus Zytokinmodulation + direkte Zytotoxizität [92]</p>
<p><u>Wirkungen:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Apoptoseinduktion [128] (<i>niedrige Dosis</i>), [27, 180] (KEINE Nekrose) uvm. - Nekroseinduktion [128] (<i>hohe Dosis</i>), [152] - charakteristische morphologische Veränderungen [27, 78, 106, 180, 244] - Zellzyklusarrest (im Normalgewebe reversibel) [27]

Nebenwirkungen:

- KEINE auf Normalgewebe [8, 27, 127, 243]
- Milde vagotone Effekte (kein Unterschied zwischen Bolus- und Langzeitapplikation) [22]

Wirkmechanismen vgl. [21, 44, 152, 178]:

- Fas-Induktion [210]
- Fas/FasL-Expression ↑ [180]
- erleichtertes Fas-cross-linking [69]
- Sauerstoffradikale ↑ [152, 180]
- Kaspasen-Aktivierung [44, 78, 143, 152, 178, 235]
- Kaspasen-unabhängig [180]
- DR-unabhängig [78]
- Bcl-2-Inhibition [78]
- Potentialverlust der Mitochondrienmembran [178, 180]
- Cytochrom-C-Efflux ↑ [78, 178]
- Cytochrom-C-unabhängig (vorhanden, aber kein Einfluss) [180]
- PARP-Cleavage [27, 44, 178]

- PARP-/p53-unabhängig (vorhanden, aber kein Einfluss) [180]
- möglicherweise veränderte Oberflächenproteine [27, 180]
- Inhibition der frühen Translation [21, 24]
- Translations-unabhängig [78]

Tab. A7: Nährmedium, Zusammensetzung

Nährmedium
92% Minimum Essentials Media (MEM) w/ Earle's Salts, Biowest Ltd. Nuaille, Frankreich
5% Fetales Kälberserum (FCS), Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
1% Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 U/ml), Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
1% L-Glutamin (5 mM), Biowest Ltd., Nuaille, Frankreich
1% Natrium-Pyruvat, Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Tab. A8: Dosisfindung, verwendete Konzentrationen

TRD	50 µmol/l	100 µmol/l	250 µmol/l	500 µmol/l	
TRAIL	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	
TRD + TRAIL	250 µmol/l 1 ng/ml	250 µmol/l 10 ng/ml	250 µmol/l 50 ng/ml	250 µmol/l 100 ng/ml	250 µmol/l 500 ng/ml

Tab. A9: Dosisfindung, verwendete Passagen

TRD	P 36#	P 37#	P 38#
TRAIL	P 36#	P 37#	P 38#
TRD+TRAIL	P 39#		

Tab. A10: TUNEL-Assay, Positiv- und Negativkontrolle

Kontrolle	Ansatz	Inkubation	Ergebnis
Positiv-Kontrolle	10 µl RNase-Free DNase I + 90 µl Stamm-lösung	10 Min., Raumtemperatur, dann weiter wie übrige Proben	Enzymatische Induktion zahlreicher DNA-Brüche, welche durch das TUNEL-Reagenz markiert werden.
Negativ-Kontrolle	50 µl Label Solution		Ohne TdT kann kein Einbau markierter Nukleotide erfolgen.

Tab. A11: BrdU-ELISA, Eichkontrollen

Kontrolle	Durchführung	Inhalt	Ergebnis
Blank	immer	Kulturmedium mit BrdU und anti-BrdU-POD ohne Zellen	unspezifische Bindung von BrdU /anti-BrdU-POD an die Kulturplatte
Background	einmalig	Zellen mit anti-BrdU-POD ohne Kulturmedium, ohne BrdU	unspezifische Bindung von anti-BrdU-POD an Zellen in Abwesenheit von BrdU

Tab. A12: RNA-Isolierung, Waschschritte zur Aufreinigung der RNA

Puffer	Zeit
350 µl RW1-Puffer	15 Sek.
80 µl DNase I-Lösung	15 Min. (Inkubation)
350 µl RW1-Puffer	15 Sek.
500 µl RPE Puffer	15 Sek.
500 µl RPE Puffer	2 Min.
<i>ohne Puffer</i>	15 Sek.
80 µl RNase-freies Wasser	

Tab. A13: NFκB –ELISA, Wasch- und Inkubationsschritte

Schritt	Durchführung	
Inkubation	1 Std.	Raumtemperatur, abgedeckt, auf dem Schüttler (100 rpm)
Waschen	3x	200 µl/well Wash Buffer (WB)
Primär-Antikörper		1:1.000 gelöst in Antibody Binding Buffer (ABB), Zugabe: 100 µl/well
Inkubation	1 Std.	Raumtemperatur, abgedeckt
Waschen	3x	200 µl/well WB
Sekundär-Antikörper		1:1.000 gelöst in ABB, Zugabe: 100 µl/well
Inkubation	1 Std.	Raumtemperatur, abgedeckt
Waschen	4x	200 µl/well WB
Developing solution		100 µl/well
Inkubation	2-10 Min.	Raumtemperatur, lichtgeschützt
Stop solution		100 µl/well

Tab. A14: Durchflusszytometrie, TRAIL

gemessene Zellpopulationen (Mittelwerte, in %) nach Inkubation mit TRAIL (10, 50, 100, 500 ng/ml) für 2, 6, 12 und 24 Std.

TRAIL10	2h	6h	12h	24h
vital	57,6266667	50,11	39,9433333	39,9733333
apoptotisch	37,05	45,3633333	55,3933333	51,06
nekrotisch	4,84666667	4,16	4,4	8,52666667
TRAIL50	2h	6h	12h	24h
vital	50,1	16,5133333	15,0733333	20,2733333
apoptotisch	44,7833333	77,0833333	76,11	66,0133333
nekrotisch	4,59	6,18333333	8,56666667	13,2466667
TRAIL100	2h	6h	12h	24h
vital	39,35	14,01	4,89	18,99
apoptotisch	55,55	80,0266667	82,43	56,2266667
nekrotisch	4,57	5,79666667	12,4566667	21,8233333
TRAIL500	2h	6h	12h	24h
vital	13,29	2,67333333	5,44333333	18,9833333
apoptotisch	82,14	86,9766667	77,7033333	58,0566667
nekrotisch	4,42666667	10,22	16,6033333	22,6133333
Kontrolle	2h	6h	12h	24h
vital	59,87	63,91	60,1166667	59,06
apoptotisch	35,815	32,22	36,3266667	35,3166667
nekrotisch	3,455	3,48333333	3,22666667	5,13333333

Tab. A15: Durchflusszytometrie, TRD

gemessene Zellpopulationen (Mittelwerte, in %) nach Inkubation mit TRD (50, 100, 250, 500 µmol/l) für 2, 6, 12 und 24 Std.

TRD50	2h	6h	12h	24h
vital	35,3333333	70,43	51,3233333	48,6766667
apoptotisch	53,05	25,72	38,5033333	44,14
nekrotisch	11,4533333	3,65	9,92666667	6,96
TRD100	2h	6h	12h	24h
vital	46,2566667	56,1	36,3866667	31,0766667
apoptotisch	47,8333333	39,02	50,55	48,8433333
nekrotisch	5,60333333	4,70666667	13,1666667	19,6966667
TRD250	2h	6h	12h	24h
vital	40,8533333	37,9833333	21,4033333	21,0866667
apoptotisch	52,1233333	57,8833333	61,96	48,4466667
nekrotisch	5,71666667	4,08	16,5533333	30,2433333
TRD500	2h	6h	12h	24h
vital	25,6766667	36,88	41,5233333	44,2566667
apoptotisch	65,54	54,55	48,9633333	42,53
nekrotisch	8,63333333	8,50333333	9,46	13,07
Kontrolle	2h	6h	12h	24h
vital	48,4433333	63,8266667	78,0266667	65,3166667
apoptotisch	47,6933333	32,3633333	18,2566667	23,3933333
nekrotisch	3,75666667	3,7	3,54	11,1866667

Tab. A16: Durchflusszytometrie, TRD + TRAIL (orientierend)

gemessene Zellpopulationen (Rohwerte in %) nach Inkubation mit TRD 250 µmol/l + TRAIL (1, 10, 50, 100, 500 ng/ml) für 6, 12 und 24 Std.

TRAIL1	6h	12h	24h
vital	56,57	66,67	20,41
apoptotisch	39,98	27,62	61,77
nekrotisch	2,6	5,71	17,41
TRAIL10	6h	12h	24h
vital	32,06	29,31	17,15
apoptotisch	60,69	34,14	40,1
nekrotisch	6,05	15,75	41,63
TRAIL50	6h	12h	24h
vital	48,74	18,88	8,81
apoptotisch	31,3	38,25	33,48
nekrotisch	13,87	41,83	57,07
TRAIL100	6h	12h	24h
vital	34,48	14,47	7,33
apoptotisch	31,86	40,56	31,38
nekrotisch	29,24	43,99	60,4
TRAIL500	6h	12h	24h
vital	26,56	11	3,84
apoptotisch	30,5	29,63	28,59
nekrotisch	39,37	58,21	66,88
Kontrolle	6h	12h	24h
vital	66,33	66,65	63,12
apoptotisch	28,55	24,21	26,68
nekrotisch	4,66	6,72	8,85

Tab. A17: Durchflusszytometrie, TRD + TRAIL (final)

gemessene Zellpopulationen (Mittelwerte, in %) nach Inkubation mit TRD 250 $\mu\text{mol/l}$, TRAIL 50 ng/ml und TRD 250 $\mu\text{mol/l}$ + TRAIL 50 ng/ml für 2, 6, 12 und 24 Std.

TRD250	2 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.
vital	64,4366667	66,4666667	60,8633333	43,26
apoptotisch	27,2566667	27,3233333	34,3166667	45,9333333
nekrotisch	7,34666667	5,56333333	4,48666667	10,3366667
TRAIL50	2 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.
vital	51,035	32,6	29,34	25,085
apoptotisch	27,7966667	46,52	51,2466667	46,63
nekrotisch	13,1233333	18,6266667	17,8833333	23,3333333
TRD250 + TRAIL50	2 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.
vital	58,3533333	29,48	14,3433333	14,38
apoptotisch	32,94	59,2433333	48,86	27,89
nekrotisch	7,60666667	10,4366667	36,3366667	55,8233333
Kontrolle	2 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.
vital	62,2933333	75,18	72,5566667	79,6033333
apoptotisch	26,4433333	12,23	16,3066667	13,12
nekrotisch	8,87	8,55	8,11666667	5,31666667

Tab. A18: BrdU-ELISA, Rohmesswerte

Kontrolle	TRD	TRAIL	TRD+TRAIL	Blank
0,595	0,112	0,346	0,115	0,059
0,953	0,115	0,331	0,103	0,055
0,817	0,113	0,292	0,099	0,045
0,785	0,109	0,246	0,131	0,048
0,713	0,107	0,268	0,119	0,043
0,725	0,116	0,274	0,122	0,045
0,813	0,105	0,182	0,094	0,043
0,699	0,103	0,094	0,091	0,039
0,715375	0,062875	0,207	0,062125	0,047125

Tab. A19: MA, Experimentalgruppen gegen Kontrolle

verlässlich gemessene Expressionsveränderungen (ca+filter1 Targets)
 Gen = Gen Symbol, Expressionsveränderung dargestellt als Signal Log Ratio (SLR)
 fett = SLR >1 oder < -1

Gen	TRD vs. Kontrolle	Gen	TRAIL vs. Kontrolle	Gen	TRD + TRAIL vs. Kontrolle
HSPA1A/B	2,99	ARHGDI	1,19	HSPA1A/B	3,28
NFKBIA	2,03	NFKBIA	1,17	NFKBIA	2,47
GADD45A	1,33	TNFAIP3	1,11	PPP1R15A	1,55
SGK	1,22	JUN	0,89	GADD45A	1,46
JUN	1,2	EGFR	0,86	AXL	1,41
PPP1R15A	0,95	CALR	0,85	SGK	1,37
MCL1	0,94	TP53	0,64	DUSP1	1,33
DUSP1	0,82	TNK2	0,58	JUN	1,31
MYC	0,78	PPP2CB	0,57	IRF1	1,23
BTG1	0,7	BAX	0,51	MYC	1,05
IRF1	0,69	IRF1	0,47	BTG1	0,85
AXL	0,64	IKBKG	0,44	DUSP5	0,65
RPS3A	0,48	BCL2L1	0,44	TIE1	0,63
LDHB	0,44	AXL	0,42	NEU1	0,63
ESD	0,43	PPP2R1A	0,41	HD	0,63
HSPD1	0,42	CD44	0,38	TNFAIP3	0,55
RPS3A	0,41	TIE1	0,37	CDKN1A	0,55
NME1	0,41	DUSP3	0,37	ACTN4	0,5
LGALS1	0,4	ACTN4	0,34	EPHA2	0,48
ENO1	0,38	PEA15	0,32	GSTP1	0,47
STK17A	0,3	DAPK3	0,31	PPM1G	0,45
API5	-0,14	ACIN1	0,31	TIAF1	0,44
DDR2	-0,15	BID	-0,23	CFL1	0,4
PDCD4	-0,17	MAP3K5	-0,27	LITAF	0,37
E2F1	-0,18	FER	-0,27	PINK1	0,36
LITAF	-0,2	FAS	-0,3	RPS3A	0,35
EPHB2	-0,21	CROP	-0,33	LGALS1	0,32
FGFR1	-0,22	HSPA9	-0,37	PPP1CA	0,29
RIPK1	-0,22	CHUK	-0,4	ENO1	0,28
CSK	-0,25	LYN	-0,43	MAP3K1	-0,04
TIE1	-0,25	CUL2	-0,47	DUSP10	-0,21
TNFRSF21	-0,25	TIA1	-0,49	FAS	-0,22
ACIN1	-0,28	PPM1B	-0,55	MCL1	-0,26

PPP3CB	-0,28	CASP8	-0,68	CUL4A	-0,26
CHUK	-0,29	MCL1	-0,7	FADD	-0,27
DAPK3	-0,29			TIA1	-0,28
PPP2R1B	-0,29			PAWR	-0,29
YWHAH	-0,29			PPP3CC	-0,31
RYK	-0,34			FOXO3	-0,32
MAP3K11	-0,35			TIA1	-0,34
BCLAF1	-0,36			RIPK2	-0,34
DOCK1	-0,4			SOCS2	-0,37
F2R	-0,4			CASP7	-0,37
SIAH1	-0,41			CALR	-0,37
AHR	-0,44			WEE1	-0,38
CASP8	-0,47			API5	-0,39
DUSP10	-0,48			MAP2K4	-0,41
MET	-0,51			ABL2	-0,42
TP53	-0,52			CUL2	-0,44
ABL2	-0,54			PPP2R1B	-0,45
IKBKG	-0,54			SIAH1	-0,46
RELA	-0,54			PPM1D	-0,46
ARHGDIA	-0,55			CHUK	-0,5
SOCS2	-0,55			BCL2L1	-0,54
TIMP3	-0,55			TIA1	-0,56
CASP2	-0,59			CASP2	-0,56
CROP	-0,59			RYBP	-0,63
PRF1	-0,64			BCLAF1	-0,64
CALR	-0,65			ARHGDIA	-0,74
WEE1	-0,66			CROP	-0,78
ERBB2	-0,8			CLK1	-0,88
CLK4	-0,81			MET	-0,91
BCL2L1	-0,82			CASP8	-0,97
BAG5	-0,9			CLK4	-0,99
CLK1	-0,92			BAG5	-1,08
MAP3K14	-1,35			BIRC3	-1,45

Tab. A20: MA, Kombination gegen Einzelsubstanzen

verlässlich gemessene Expressionsveränderungen (ca+filter1 Targets)
 Gen = Gen Symbol, Expressionsveränderung dargestellt als Signal Log Ratio (SLR)
 fett = SLR >1 oder < -1

Gen	TRD+TRAIL vs. TRD	Gen	TRD+TRAIL vs. TRAIL
TIE1	0,89	HSPA1A/B	2,96
AXL	0,85	GADD45A	1,55
IRF2	0,76	SGK	1,45
ERBB2	0,71	NFKBIA	1,3
RELA	0,69	PPP1R15A	1,22
TIAF1	0,69	AXL	1,16
TIMP3	0,67	MYC	1,01
DUSP5	0,66	DUSP1	0,98
PPP1R15A	0,61	IRF1	0,84
LITAF	0,6	BTG1	0,84
IRF1	0,6	BCL2A1	0,52
TP53	0,57	BAG1	0,46
TYRO3	0,55	NEU1	0,41
LTBR	0,55	JUN	0,39
TYK2	0,54	ANXA4	0,37
SIPA1	0,54	GSTP1	0,31
TRAF4	0,53	CROP	-0,24
DOCK1	0,53	CASP8	-0,24
CSK	0,52	PPM1D	-0,31
ACIN1	0,52	API5	-0,32
ARHGDI1A	0,49	TNFRSF10B	-0,34
ABCA2	0,48	FOXO1	-0,37
TNFRSF25	0,47	RAD21	-0,38
TNFRSF1A	0,47	EGFR	-0,39
FGFR1	0,47	DUSP10	-0,45
DNM2	0,47	NFKB1	-0,46
NFKBIA	0,45	FOXO3	-0,46
EPHB2	0,45	RYBP	-0,49
IRF3	0,42	MCL1	-0,49
DDR2	0,42	DUSP3	-0,53
WEE1	0,38	BCLAF1	-0,56
E2F1	0,36	TP53	-0,58
BAK1	0,36	HELLS	-0,61

PPM1G	0,34	PPP2CB	-0,62
FYN	0,31	DAPK3	-0,64
RYK	0,3	TNFAIP3	-0,67
DUSP1	0,3	SOCS2	-0,71
ACTN4	0,3	CLK1	-0,72
CTSB	0,28	IKBKG	-0,74
HSPA1A/B	0,25	BAG5	-0,97
SART1	0,24	BCL2L1	-0,99
DHCR24	0,24	CLK4	-1,02
JUN	0,23	MET	-1,05
PPP4C	0,22	CALR	-1,23
PPP2R1A	0,21	MAP3K1	-1,32
GSTP1	0,21	MAP3K14	-1,34
YWHAH	0,2	CASP2	-1,7
PDCD4	0,18	ARHGDI A	-1,95
FXR1	-0,24	BIRC3	-2,32
PHB	-0,28		
YES1	-0,29		
CUL2	-0,38		
CUL4A	-0,39		
CASP7	-0,42		
BCLAF1	-0,42		
CASP8	-0,49		
MET	-0,53		
TFG	-0,84		
MCL1	-1,5		

Tab. A21: Validierung, Daten der PCR (SLR)

	ARGHGDI A	BIRC3	GADD34
Taqman assay	Hs00976924_g1	Hs00154109_m1	Hs00169585_m1
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	-0,4205	-1,1638	1,2819
TRAIL vs. Kontrolle	-0,1207	1,1527	0,2107
TRD vs. Kontrolle	0,0120	-0,3926	1,4327
TRD+TRAIL vs. TRAIL	-0,2998	-2,3165	1,0712
TRD+TRAIL vs. TRD	-0,4325	-0,7712	-0,1508
	HSPA1A	HSPA1B	MAP3K14
Taqman assay	Hs00359163_s1	01040501_+sH	Hs01089753
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	3,8893	3,1561	-0,8706
TRAIL vs. Kontrolle	0,4395	0,4545	0,1833
TRD vs. Kontrolle	3,6653	3,5939	-0,7547
TRD+TRAIL vs. TRAIL	3,4498	2,7016	-1,0539
TRD+TRAIL vs. TRD	0,2240	-0,4378	-0,1159
Gene Symbol	MAP3K1	GADD45A	NFKBIA
Taqman assay	Hs00394890_m1	Hs00169255_m1	Hs00153283_m1
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	-0,5410	2,4504	2,3151
TRAIL vs. Kontrolle	0,0203	0,7523	1,5287
TRD vs. Kontrolle	-0,1194	2,8888	2,5517
TRD+TRAIL vs. TRAIL	-0,5613	1,6981	0,7864
TRD+TRAIL vs. TRD	-0,4217	-0,4385	-0,2366

Tab. A22: Validierung, Daten des Microarray (SLR)

Gene Symbol	ARHGDI1	ARHGDI1	//
Probeset	201167_x_at	LOC728908	201168_x_at
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	-0,74		
TRAIL vs. Kontrolle	1,19	0,43	
TRD vs. Kontrolle	-0,55	-0,28	
TRD+TRAIL vs. TRAIL	-1,95		
TRD+TRAIL vs. TRD		0,49	
Gene Symbol	BIRC3	GADD45A	NFKB1A
Probeset	210538_s_at	203725_at	201502_s_at
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	-1,45	1,46	2,47
TRAIL vs. Kontrolle			1,17
TRD vs. Kontrolle		1,33	2,03
TRD+TRAIL vs. TRAIL	-2,32	1,55	1,3
TRD+TRAIL vs. TRD			0,45
Gene Symbol	HSPA1A	HSPA1A//1B	HSPA1B
Probeset	200799_at	200800_s_at	202581_at
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	2,54	3,28	2,45
TRAIL vs. Kontrolle			
TRD vs. Kontrolle	2,49	2,99	2,06
TRD+TRAIL vs. TRAIL	2,61	2,96	2,44
TRD+TRAIL vs. TRD		0,25	0,43
Gene Symbol	MAP3K1	MAP3K14	GADD34
Probeset	214786_at	205192_at	202014_at
TRD+TRAIL vs. Kontrolle	-0,04		1,55
TRAIL vs. Kontrolle			
TRD vs. Kontrolle		-1,35	0,95
TRD+TRAIL vs. TRAIL	-1,32	-1,34	1,22
TRD+TRAIL vs. TRD			0,61

Tab. A23: NFκB-ELISA, Rohwerte

SD = Standard Abweichung

Blank	0,074	0,075	0,124	0,091	
p50			Mittelwert (MW)	MW - Blank	SD
Standard	1,523			1,432	
Kontrolle	0,697	0,726	0,7115	0,6205	0,0205061
TRD	0,822	0,747	0,7845	0,6935	0,05303301
TRAIL	0,73	0,685	0,7075	0,6165	0,03181981
TRD+TRAIL	1,036	0,851	0,9435	0,8525	0,13081475
p52			Mittelwert (MW)	MW - Blank	SD
Standard	0,477			0,386	
Kontrolle	0,169	0,175	0,172	0,081	0,00424264
TRD	0,149	0,132	0,1405	0,0495	0,01202082
TRAIL	0,149	0,157	0,153	0,062	0,00565685
TRD+TRAIL	0,15	0,133	0,1415	0,0505	0,01202082
p65/RelA			Mittelwert (MW)	MW - Blank	SD
Standard	2,844			2,753	
Kontrolle	0,323		0,323	0,232	
TRD	0,548	0,333	0,4405	0,457	0,15202796
TRAIL	0,433	0,21	0,3215	0,342	0,15768481
TRD+TRAIL	0,639	0,503	0,571	0,548	0,09616652
RelB			Mittelwert (MW)	MW - Blank	SD
Standard	1,11			1,019	
Kontrolle	0,205	0,161	0,183	0,114	0,0311127
TRD	0,136	0,137	0,1365	0,045	0,00070711
TRAIL	0,165	0,154	0,1595	0,074	0,00777817
TRD+TRAIL	0,129	0,13	0,1295	0,038	0,00070711
c-Rel			Mittelwert (MW)	MW - Blank	SD
Standard	0,359			0,268	
Kontrolle	0,151	0,158	0,1545	0,06	0,00494975
TRD	0,151	0,161	0,156	0,06	0,00707107
TRAIL	0,144	0,155	0,1495	0,053	0,00777817
TRD+TRAIL	0,157	0,156	0,1565	0,066	0,00070711

Tab. A24: Gene, Zusatzinformationen

(Expression aller genannten Gene mehr als zweifach verändert im Experiment)

Gen	Name	Synonyme	Funktionen
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IkappaB-alpha, IκB-α, IκBa, Inhibitor of kappa B-alpha, MAD3, P40	<p>Proliferation von HT1080 Zellen wird durch NFKB-abhängige Pathways vermittelt [28, 159].</p> <p>Die Invasivität von HT1080 kann durch eine Reduktion der NFKB-Aktivität signifikant vermindert werden [160].</p> <p>Erhöhte NFKB-Aktivität führt zu einer p53-abhängigen Resistenz gegen Doxorubicin [87].</p>
HSPA1A/B	heat shock 70kDa protein 1A/B	HSP70, HSP72, HSPA1	<p>Hochregulation von HSPA1A erhöht signifikant die Chemosensitivität von HT1080 gegenüber Mitomycin C [141].</p> <p>Die Apoptose-induzierende Wirkung von Taxanen auf Sarkome kann durch zusätzliche Behandlung mit Stimulanzen der HSPA1A-Expression verstärkt werden [65].</p>
SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase	serine/threonine-protein kinase Sgk1, serum/glucocorticoid-regulated kinase 1, SGK1	<p>SGK induziert den NFKB-Pathway und kann so in einigen Zellen die Apoptose hemmen [249].</p>
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	DDIT1, DNA-damage-inducible transcript 1, GADD45, Growth arrest and DNA-damage-inducible protein, GADD45 alpha	<p>Hochregulation von GADD45A wird mit vermehrter Apoptose und p53-unabhängigem Zellzyklusarrest bei einer Reihe von Weichgewebssarkomen in Verbindung gebracht [254].</p> <p>Es inhibiert Transkriptionsfaktoren, die das Tumorstadium begünstigen, darunter auch die JNK-Kaskade und NFKB [95, 114, 129, 157].</p>

			<p>Bei Rhabdomyosarkomen ist die verstärkte Expression von GADD45A mit weniger aggressivem Tumorverhalten assoziiert [97].</p> <p>GADD45 vermag die TNF-Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität abzuschwächen [157].</p>
ARHGDI1	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	GDIA1, MGC117248, RHOGDI, Rho GDI 1, Rho-GDI alpha, Rho GDP-dissociation inhibitor 1	<p>In HT1080 Zellen werden hohe Level von Rho-GTP beobachtet. Die Hemmung von Rho durch Fasudil, einen Rho-Kinase-Inhibitor, führt zu verminderter Tumorzellmotilität und -wachstum bei HT1080 Zellen [245] und wird mit der Metastasierung diverser anderer maligner Tumoren in Verbindung gebracht [45, 153].</p> <p>In HT1080 Zellen wird ARHGDI1 durch Doxorubicin supprimiert [118].</p>
GADD34/ PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	GADD34, MyD116	<p>Vermehrte Expression von PPP1R15A durch Chemosensitizer kann den Effekt von Zytostatika wie Platinpräparaten potenzieren [62] und geschieht wahrscheinlich p53-unabhängig [84].</p>
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc, Myc proto-oncogene protein, transcription factor p64	<p>MYC bewirkt Apoptose durch JNK-abhängig erhöhte p53-Level [217, 247].</p>
AXL	AXL receptor tyrosine kinase	oncogene tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor, UFO	<p>AXL beeinflusst das Metastasierungspotential maligner Zellen durch Regulierung von Zellhaftung, -motilität und -invasivität [140].</p> <p>Es kann den TNFα-vermittelten Zelltod mithilfe der Phosphatidylinositol 3-Kinase [197] und dem NFκB-Pathway verhindern [51].</p>

MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	FTDCR1B, HS, HsNIK, HSNIK, mitogen-activated protein kinase kinase 14, NFκB-inducing kinase, NIK, serine/threonine-protein kinase NIK	MAP3K14 ist ein Bestandteil des TNF-Signaltransduktionswegs und aktiviert NFκB (IKKα) [195]. Der MAPkinase-Pathway kann durch Induktion von Genen der GADD-Familie (GADD 34, GADD 45) zur Apoptose führen [188].
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	AIP1, API2, apoptosis inhibitor 2, Baculoviral IAP repeat-containing protein 3, cIAP2, CIAP2, C-IAP2, HAIP1, HIAP1, hiap-1, HIAP-1, IAP1, IAP homolog C, inhibitor of apoptosis protein 1, MALT2, MIHC, RNF49, TNFR2-TRAF signalling complex protein 1	BIRC3 ist mit Chemo-Resistenzen bei Ewing-Sarkomen, Rhabdomyosarkomen [107] und Prostatakarzinomen assoziiert [145] und hemmt den TNFα-induzierten Zelltod, indem es die Formation des TNF-Rezeptor 1 supprimiert. Es beeinflusst die NFκB-Signaltransduktion in Richtung Zell-Überleben durch vermehrten Abbau von MAP3K14 [224].
CALR	calreticulin	calregulin, calreticulin precursor, cC1qR, CRP55, CRTC, ERp60, FLJ26680, grp60, HACBP, RO, SSA	Calreticulin gehört zur Familie der Hitzeschockproteine und bindet mit hoher Affinität an TRAIL [55]. Nach Therapie mit Anthrazyklinen transloziert Calreticulin in die Tumorzellmembran und provoziert eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort [29].
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	CL100, dual specificity protein phosphatase 1, dual specificity protein phosphatase hVH1, HVH1, MAP kinase phosphatase 1, MKP1, MKP-1, protein-tyrosine phosphatase CL100, PTPN10, VH1	DUSP inaktiviert die MAP-Kinasen [1] und kann Zellen vor Apoptose auslösenden Stimuli durch Chemotherapeutika schützen [229].
JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	activator protein 1, AP1, p39, proto-oncogene c-jun, transcription factor AP-1	JUN wird JNK-abhängig durch TRAIL inaktiviert und induziert den apoptotischen Zelltod maligner Zellen unter anderem bei Osteosarkomen [67, 129].

		V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	<p>Die Herunterregulation von JUN vermindert die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und somit die Invasivität von HT1080 Zellen [172]. Dies wird möglicherweise durch Suppression der NFκB-Aktivierung erreicht [158].</p> <p>JUN ist bekanntermaßen ein Produkt der MAP2K4-Aktivierung und vermittelt die Apoptosedinduktion vieler Chemotherapeutika [100, 114].</p> <p>Hochregulation der Expression von HSPA1A und JUN erhöht signifikant die Chemosensitivität von HT1080 gegenüber Mitomycin C [141].</p>
IRF1	interferon regulatory factor 1	MAR	IRF1 hemmt das Zellwachstum und induziert Apoptose via Aktivierung der Kaspasen 1 und 7 [184, 215]. Es hemmt NFκB-abhängig die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP9) [185].
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	A20, MGC104522, MGC138687, MGC138688, Putative DNA-binding protein A20, TNFA1P2, Zinc finger protein A20	TNFAIP3 supprimiert die TNF-α-vermittelte NFκB-Signaltransduktion [37] und hemmt die TNF-induzierte Apoptose und Nekrose [80].
BAG5	BCL2-associated athanogene 5	BAG-5, BAG family molecular chaperone regulator 5, KIAA0873	Mitglieder der BAG-Familie inhibieren Hsp70 und fördern Zellwachstum und -überleben [36].
CLK4	CDC-like kinase 4	Dual specificity protein kinase CLK4	Mitglieder der CLK-Familie hemmen den intrinsischen Apoptose-Pathway [213].
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	c-Met, Hepatocyte growth factor receptor precursor, HGF/SF receptor, HGFR, HGF receptor, Met proto-oncogene tyrosine kinase, RCCP2,	Überexpression von MET wird mit vermehrter Proliferation und aggressivem Tumorverhalten bei Sarkomen in Verbindung gebracht [181]. Zellüberleben, Zellwachstum abhängig von Zellkontakten sowie Invasivität sind in Sarkomen abhängig von

		Scatter factor receptor, SF receptor	MET [216].
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	Bcl-2-related protein EAT/mcl1, EAT, Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1, mcl1/EAT, MCL1L, MCL1S, MGC104264, MGC1839, TM	MCL1 wird in einer Reihe von Weichgewebssarkomen exprimiert und fungiert anti-apoptotisch. Inhibition von MCL1 in Kombination mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid bewirkt signifikant verstärkt Apoptose in HT1080 Zellen [219].
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAPK/ERK kinase kinase 1, MAPKKK1, MEKK, MEKK1, MEKK 1, MEK kinase 1	MEKK aktiviert MAPK und JNK. Reduktion der MEKK-Aktivität vervielfacht den apoptose-induzierenden Effekt von TNF α auf Fibrosarkomzellen [241].
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2), CASP-2, Caspase-2 precursor, ICH1, ICH-1L, ICH-1L/1S, ICH-1 protease, NEDD2	Casp2 gehört zur Familie der Kaspasen und vermittelt Apoptose in Abhängigkeit von NF κ B und JUN, jedoch unabhängig von Fas [75].

Tab. A25: NFκB, Untereinheiten

NFκB	Literatur
<p>Die Untereinheiten von NFκB sind Gegenstand einer Vielzahl von Studien, Erkenntnisse über Funktion und Differenzierung der einzelnen Untereinheiten wurden vor allem durch Forschung an neuronalen Zellen im Xenograft-Modell gewonnen.</p>	
<p>NFκB besitzt fünf Untereinheiten, Gemeinsames Strukturelement: RHD (Rel-homology domain) [148]</p> <ul style="list-style-type: none"> - vermittelt die Dimerisierung <ul style="list-style-type: none"> ➔ Homodimere ➔ Heterodimere - vermittelt die Bindung an regulatorische Abschnitte der DNA (sog. κB-Motive) [148] <ul style="list-style-type: none"> ➔ (häufig) Aktivierung oder ➔ (selten) Repression der Transkription [81] 	
<p>Es gibt 15 potentielle Dimere:</p> <ul style="list-style-type: none"> - davon 9 potentielle Aktivatoren der Transkription (vor allem die sehr häufigen RelA:p50 Heterodimere) [148] - p50:p50, p52:p52 und p50:p52 binden DNA, aktivieren aber die Transkription nur bei Bindung spezifischer Ko-Aktivatoren [148] - RelA:RelB, RelB:RelB und c-Rel:RelB binden nicht an DNA [82] 	
<p>Zielgerichtete Transkriptions-Aktivierung ist möglich durch sog. TADs (transcription activation domains)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bestandteil von Rel-Untereinheiten [82] - nicht enthalten in p50, p52 [218] <ul style="list-style-type: none"> ➔ daher wahrscheinlich Repression durch p50- bzw. p52-Homodimere 	
<p>p50 und p52 werden als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert (p105 und p100) [40]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aktivierung erfolgt durch Abspalten einer c-terminalen inhibitorischen Sequenz (ARD – ankyrin repeat domain), erst dann ist eine DNA-Bindung möglich - Dimerisierung der Vorläufer mit anderen Untereinheiten führt zu sich selbst inhibierenden Komplexen [148] - die ARD entspricht der inhibitorischen Komponente von IκB-Proteinen [148] 	
<p>Die spezifische Interaktion einzelner Untereinheiten mit bestimmten Genen wurde gezeigt z.B. für :</p> <ul style="list-style-type: none"> - c-Rel mit JNK1 [186] - c-Rel mit NIK [186] - p50 mit c-Jun [38, 199, 208] - RelA mit c-Jun [38, 199, 208] 	

<p>c-Rel</p> <ul style="list-style-type: none"> - Depletion von c-Rel in neuronalen Zellen (Maus/Ratte) verwandelte die Wirkung von IL-1β (Entzündungsmediator) in Zytotoxizität: offenbar spielt c-Rel eine wichtige Rolle für das Überleben dieser Zellen [168] - Abweichungen im Kerngehalt an c-Rel-Dimeren beeinflussen die Schwelle neuronaler Vulnerabilität gegenüber Ischämie [189] - Tumorzellen weisen häufig vermehrt c-Rel auf [189] - c-Rel-Dimere verstärken spezifisch die Expression des anti-apoptotischen Bcl-XL [148]
<p>p50 (NFκB1)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Zusammenhang mit verstärkter Transkription des Bcl-2-Gens \rightarrow Apoptose-Inhibition [113]
<p>RelA (p65)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Beteiligung am induzierten Zelltod in neuronalen Zellen (Maus, Ratte) [168] - Translokation von RelA bei Leukämie
<p>p50:RelA</p> <ul style="list-style-type: none"> - agiert als Transkriptionsaktivator der pro-apoptotischen Bcl-2-Gene Bim und NOXA [148]
<p>Fazit:</p> <ul style="list-style-type: none"> - einzelnen Untereinheiten kann eine spezifische Rolle zugewiesen werden - nicht nur die Untereinheiten, auch ihre Komposition sind ausschlaggebend für Einfluss auf Genexpression - hohe Komplexität der Wechselwirkungen, s.u.
<p>Wechselwirkungen zusätzlich mit Proteinen außerhalb der NFκB-Familie, z.B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - p50 und Rel A interagieren mit c-Jun [38, 199, 208] - c-Jun seinerseits interagiert mit IκBα und IκBβ [38, 199, 208] - IκBα wiederum hemmt RelA durch Komplexierung von p50:RelA-Dimeren und verhindert deren Bindung ans κB-Motiv [79] - andere Mitglieder der IκB-Proteinfamilie (Bcl3, IκBζ/MAIL, IκBNS) können als Ko-Aktivatoren für allein nicht transkriptionsaktivierende NFκB-Dimere wirken [148]

Abbildungen

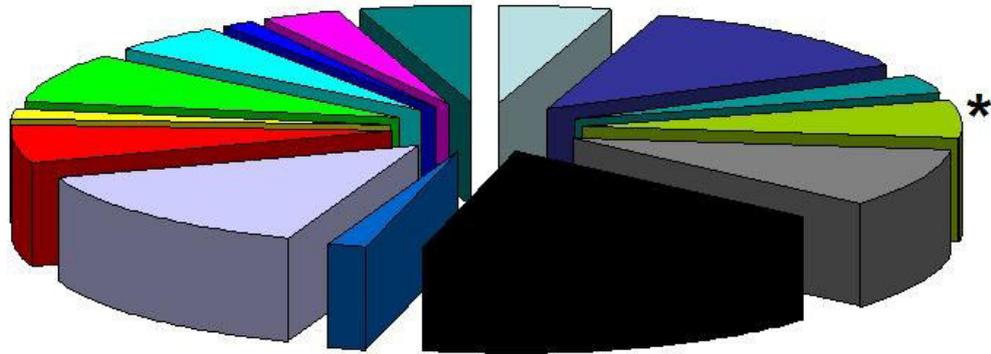


Abb. A1: Sarkome 2009, n=63

Datenauszug aus dem Weichteiltumorregister des Institutes für Pathologie, Univ.-Klinikum Bochum (BHL), zur Verfügung gestellt von Prof. H.U. Steinau
* = Fibrosarkome: n=4

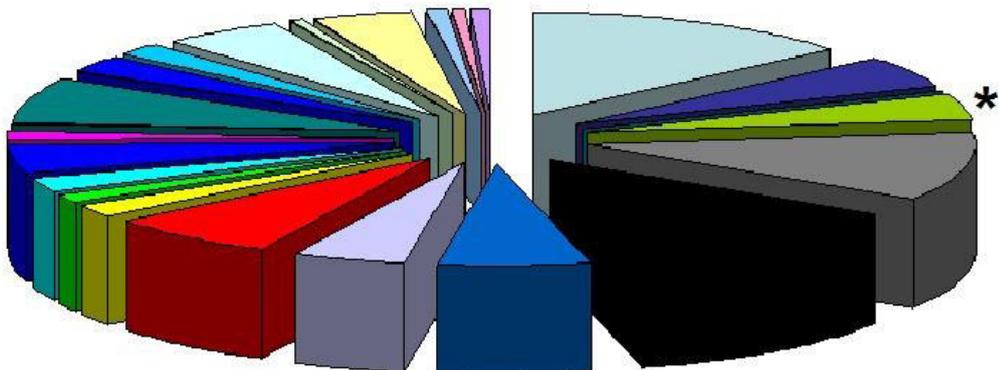


Abb. A2: Sarkome 2008, n=143

Datenauszug aus dem Weichteiltumorregister des Institutes für Pathologie, Univ.-Klinikum Bochum (BHL), zur Verfügung gestellt von Prof. H.U. Steinau
* = Fibrosarkome: n=6

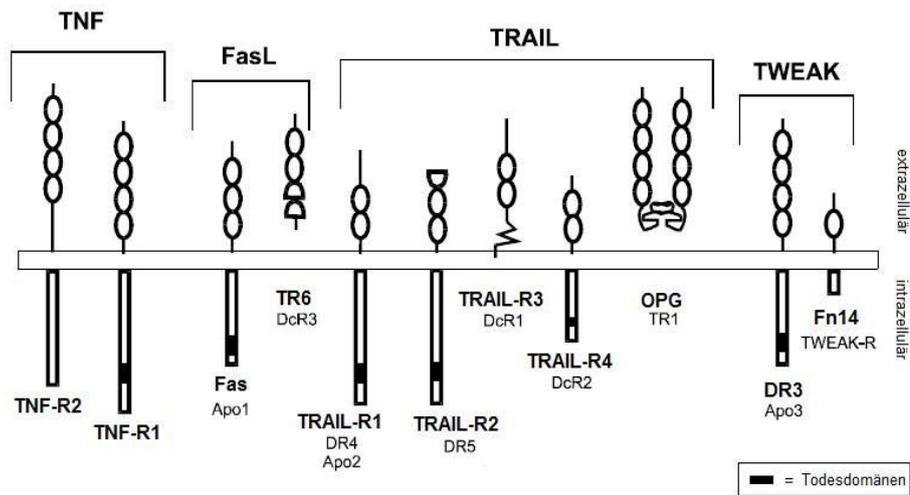


Abb. A3: TNF-Superfamilie
Liganden und ihre zugehörigen Rezeptoren

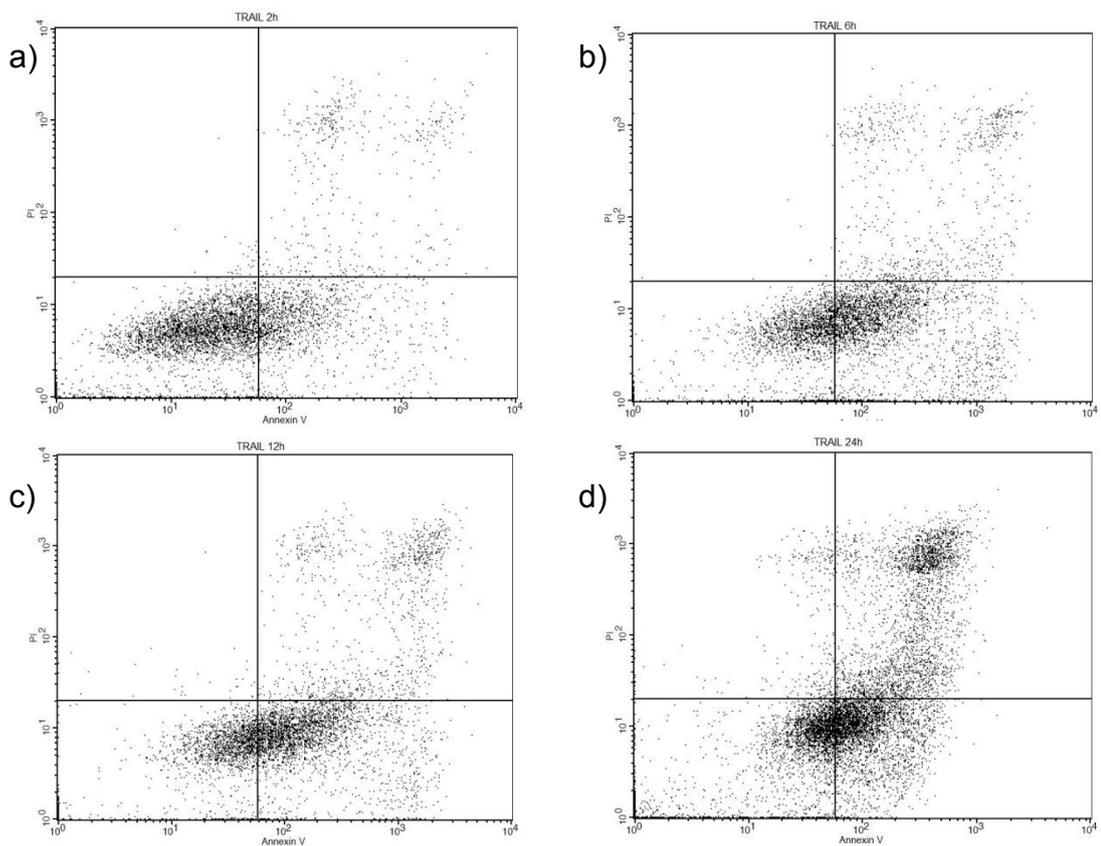


Abb. A4: Dot-Plot Grafik, TRAIL
Apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL 50 ng/ml nach 2 (a), 6 (b), 12 (c) und 24 (d) Inkubationszeit

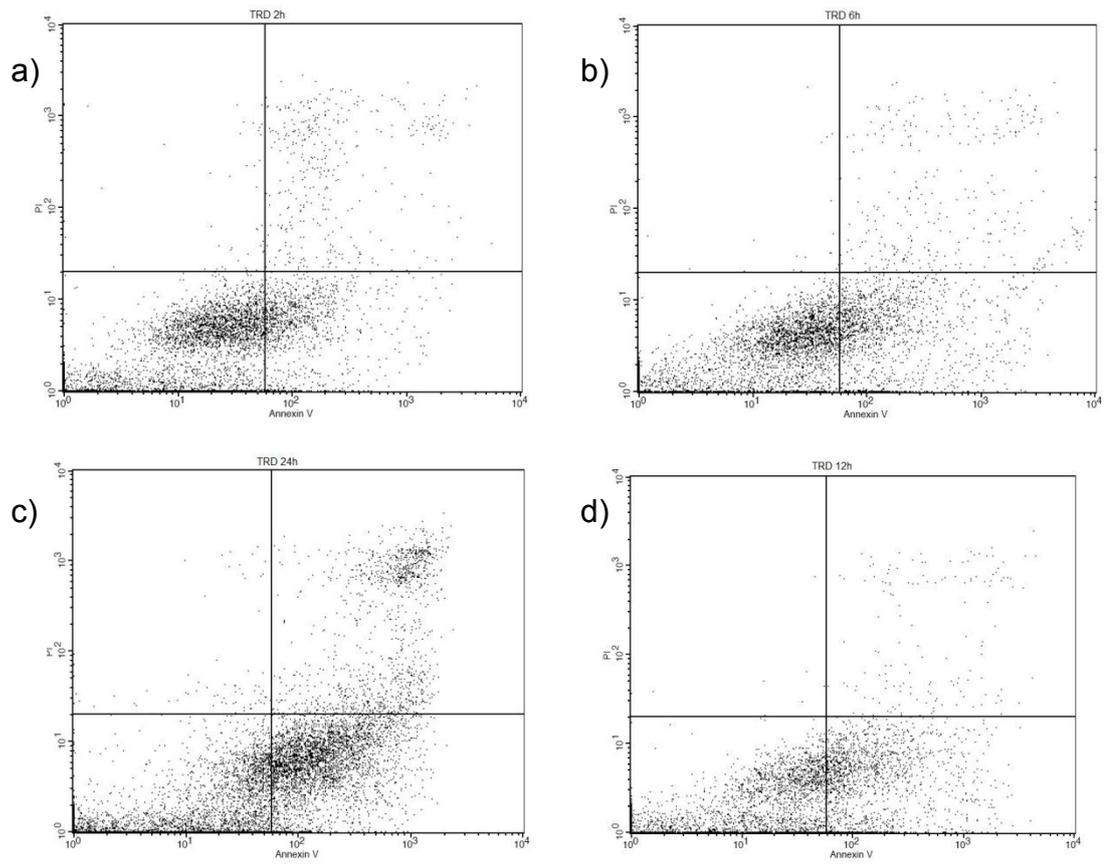


Abb. A5: Dot-Plot Grafik, TRD

Apoptoseinduzierende Wirkung von TRD 250 µmol/l nach 2 (a), 6 (b), 12 (c) und 24 Std. (d) Inkubationszeit

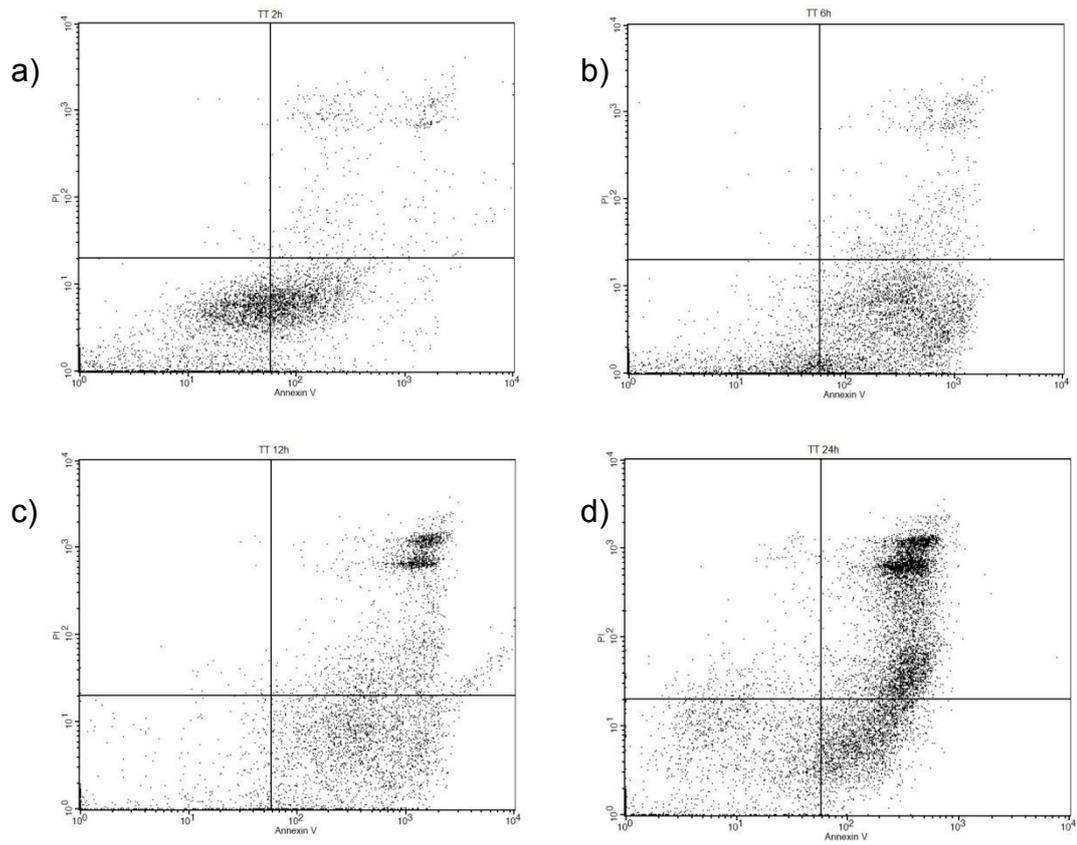


Abb. A6: Dot-Plot Grafik, TRAIL + TRD

Apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL 50 ng/ml + TRD 250 μ mol/l nach 2 (a), 6 (b), 12 (c) und 24 Std. (d) Inkubationszeit

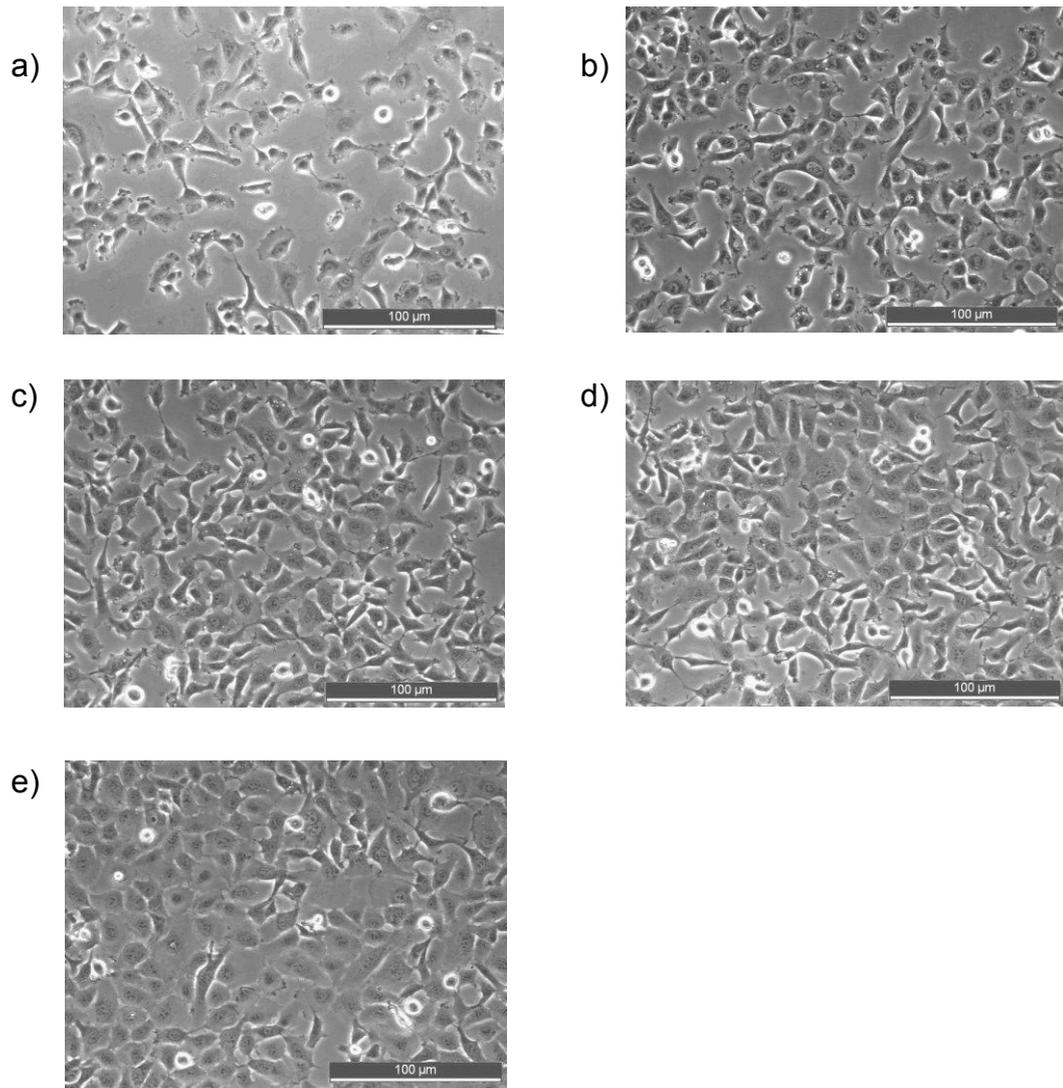


Abb. A7: Zellwachstum einer unbehandelten HT1080 Kultur
Lichtmikroskopie: 12 (a), 24 (b), 36 (c), 48 (d) und 60 (e) Std. nach Aussaat

a)



b)

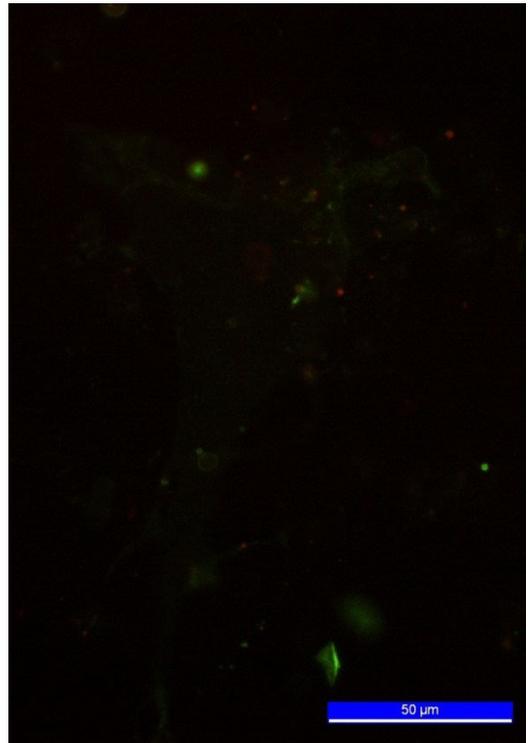


Abb. A8: Vitale HT1080 Zelle
Durchlicht- (a) und Fluoreszenzaufnahme (b)
Färbung: Annexin/FITC, PI

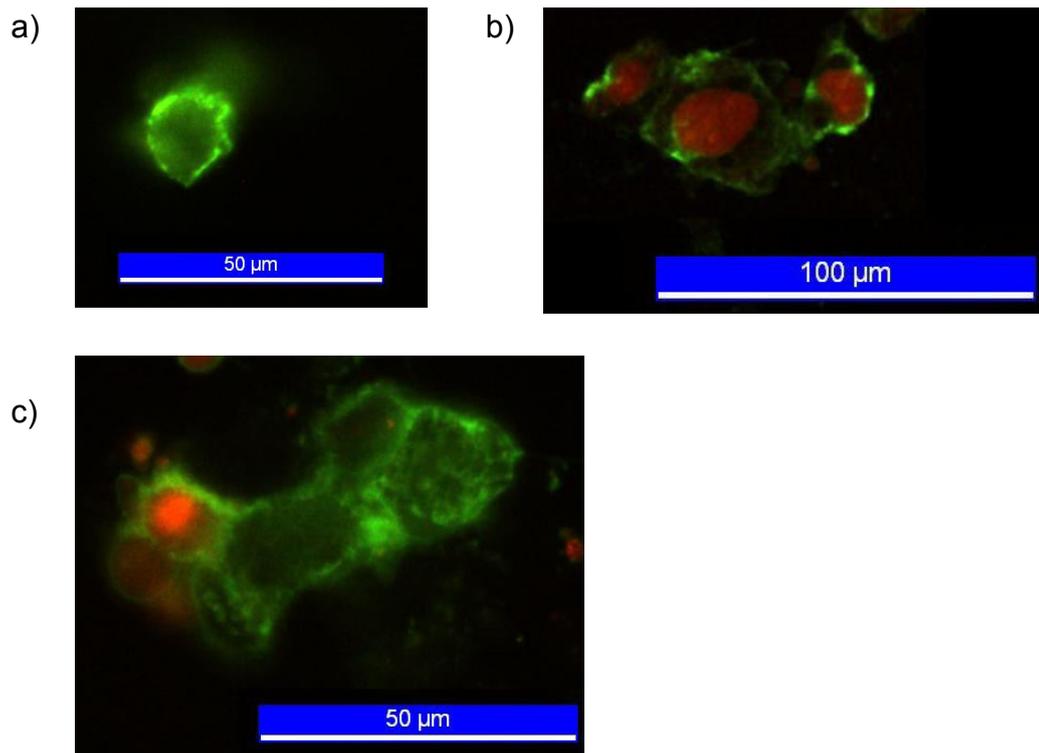


Abb. A9: Fluoreszenzmikroskopie, Beispiele apoptotische (a), nekrotische (b) sowie apoptotische und nekrotische (c) HT1080 Zellen nebeneinander

Färbung: Annexin/FITC, PI

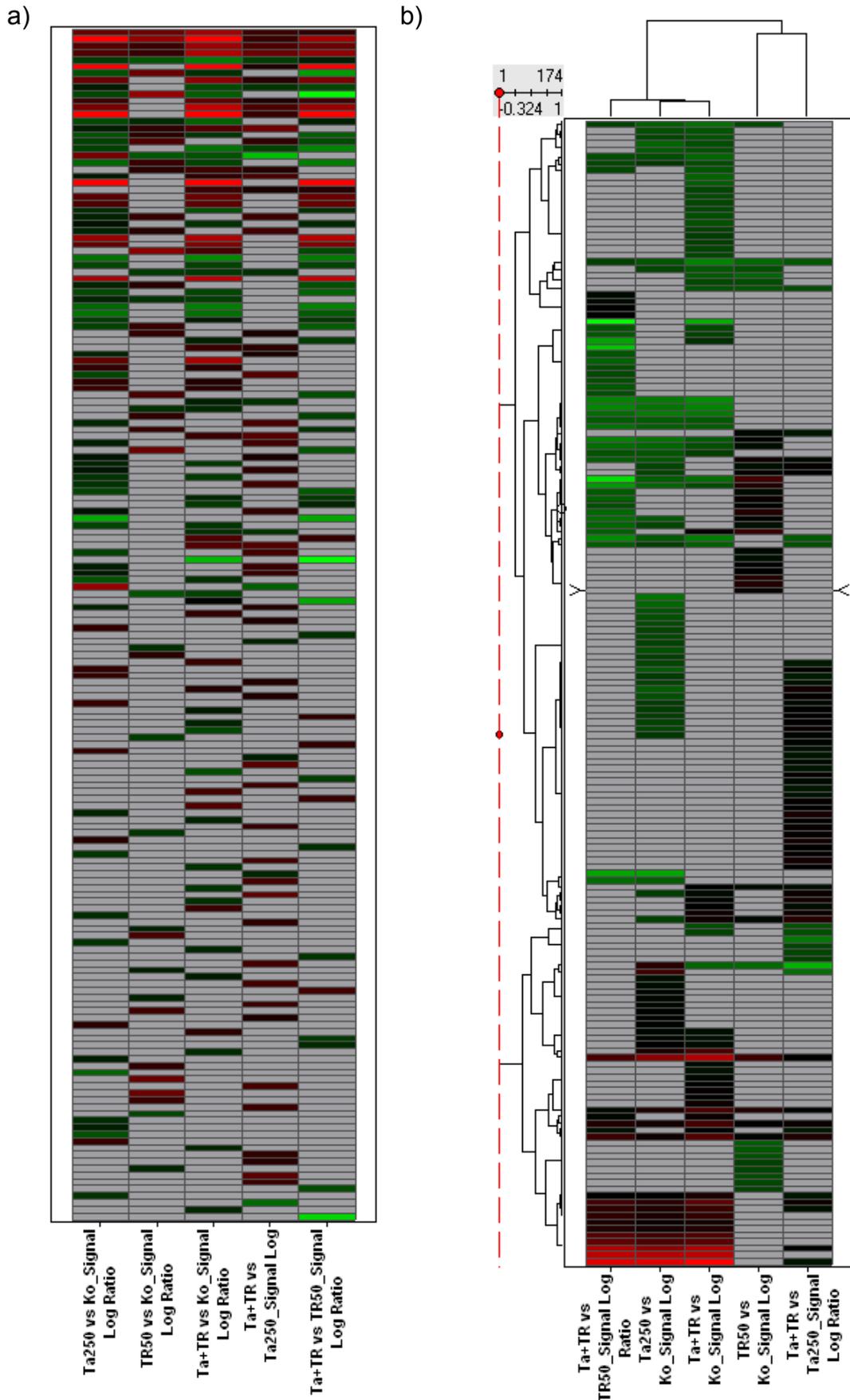


Abb. A10: Microarray, Heat Map
Ergebnisse (ca+filter1 Targets) als Heat Map: vor (a) und nach (b) Clustering

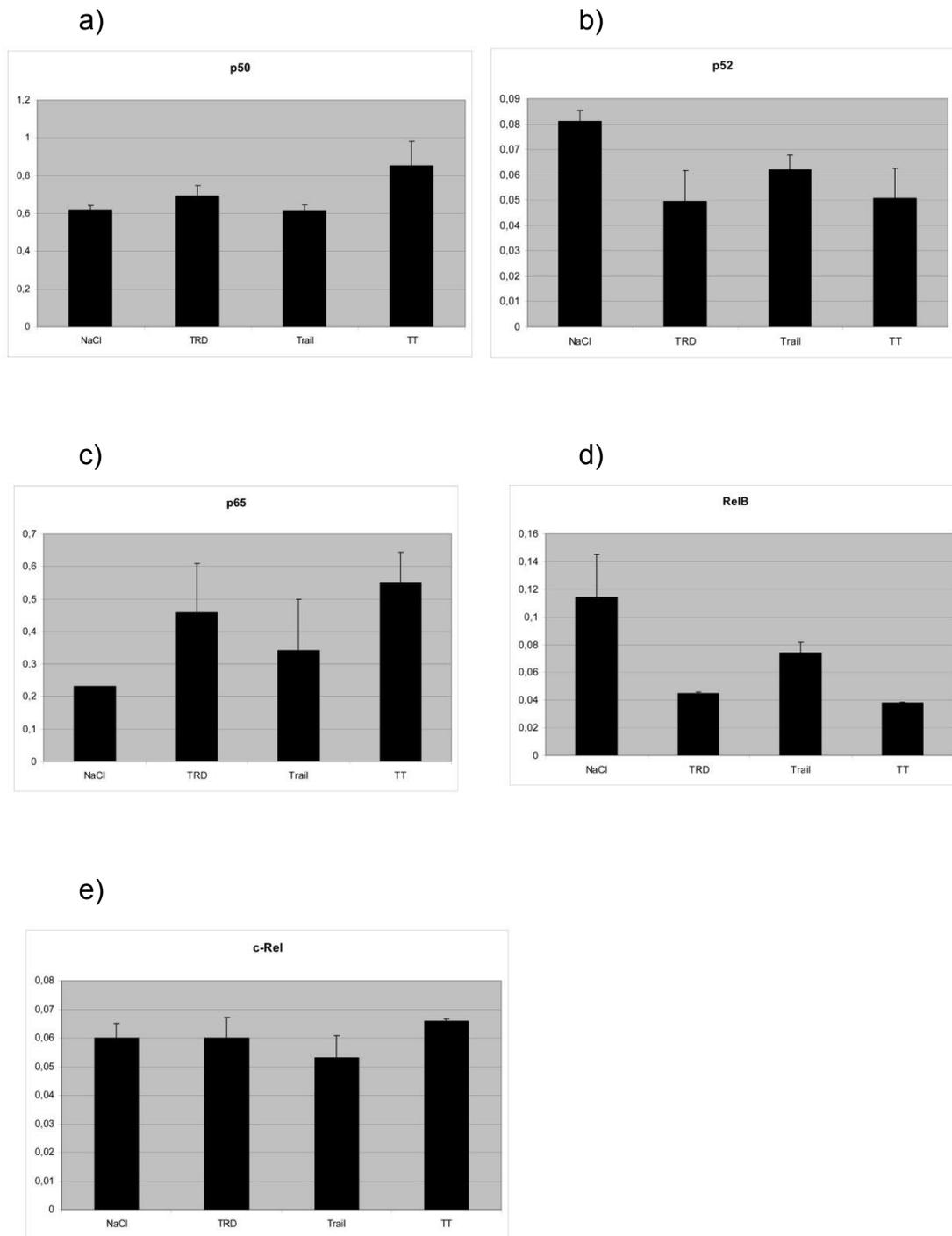


Abb. A11: NFκB-ELISA

Ergebnisse für die Untereinheiten p50 (a), p52 (b), p65/RelA (c), RelB (d) und c-Rel (e)

Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion und ihre Unterstützung als Leiter unserer Arbeitsgruppe bedanke ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. H.-U. Steinau, Direktor der Klinik für Plastische Chirurgie am Klinikum Bergmannsheil Bochum sowie Herrn Prof. Dr. med. W. Uhl, Direktor der Chirurgischen Klinik am St. Josef-Hospital Bochum.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. A. Daigeler für die Überlassung des Themas der Dissertation und die fachliche und auch persönliche Betreuung während dieser Arbeit. Eine bessere, zuverlässigere, nettere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können!

Weiterhin danke ich Frau Annegret Flier für die unschätzbare Hilfe bei der Bewältigung der unterschiedlichen Methoden sowie allen Mitarbeiterinnen des wissenschaftlichen Labors des St. Josef- Hospitals, Universitätsklinikum der Ruhr Universität Bochum, für die vielen hilfreichen Tipps, die Bereitstellung von Materialien und die nette Zeit, die ich dort verbringen durfte.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. L. Klein-Hitpass vom IFZ der Universität Duisburg-Essen für die Zusammenarbeit bei Erstellung und Auswertung der Microarrays, Herrn Dr. med. D. Bulut für die Betreuung der Durchflusszytometrie und Christoph Hilgert für die fachliche Unterstützung zum Thema Fluoreszenzmikroskopie; darüber hinaus Anne Geisler für die gute Einarbeitung sowie Carmen Klink für die Hilfe im Kampf mit SPSS.

Ich danke meiner Schwester Stefanie Brenzel für ihre große Hilfe bei Übersetzungsfragen und der Korrektur, sowie Nadine Matatko, Sebastian Goß und Daniel Lankers, die mir manche wertvolle Erfahrung mit ihrer eigenen Dissertation zur Verfügung gestellt haben.

Von Herzen Dank an meine Familie, meinen Vater Friedrich-Wilhelm Brenzel und meine Mutter Renate Brenzel, die mich nicht nur während dieser Arbeit sondern ein Leben lang getragen und unterstützt haben.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem Mann Rolf Brenzel-Thißen, der nicht nur in Computerfragen ein unersetzbarer Partner für mich ist. Du gibst mir jeden Tag die Kraft, weiterzumachen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Christina Brenzel
Geburtstag/-ort 13.07.1982 in Bielefeld
Familienstand verheiratet

Schulbildung

1989-1993 Frölenbergschule, Bielefeld (Grundschule)
1993-1999 Ratsgymnasium, Bielefeld
1999-2000 Ashbury College, Ottawa, Kanada (ON)
2000-2002 Ratsgymnasium, Bielefeld
Abitur

Hochschulbildung

2002-2003 Studium der Biomedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2003-2009 Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2008/2009 Praktisches Jahr:

- Abteilung für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie der LWL-Kliniken Dortmund,
- Department of Surgery des New Somerset Hospital in Kapstadt, Südafrika
- Medizinische und Chirurgische Klinik des St. Josef-Hospital Bochum

12/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

Beruf

seit 2010 Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im Helios Klinikum Schwelm