

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

**Intrazelluläre Apoptosemechanismen durch TRAIL und
Bestrahlung in Lymphomzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Elise Odette Durand

aus Königstein im Taunus

2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. C. Belka
2. Berichterstatter:	Professor Dr. S. Wesselberg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis:	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Wirkung ionisierender Strahlung	1
1.2 Apoptose	3
1.2.1 Die Komponenten des apoptotischen Programms	8
1.2.1.1 Caenorhabditis elegans	8
1.2.1.2 Caspasen, die Effektoren der Apoptose	9
1.2.1.3 Der mitochondriale Apoptoseweg	13
1.2.1.4 Bcl-2, hemmendes Molekül der mitochondrialen Apoptose	16
1.2.1.5 Der zelltodrezeptor- vermittelte Apoptoseweg	16
1.2.1.6 TRAIL-Rezeptoren	17
1.3 Therapeutische Nutzung von TRAIL	20
1.4 Fragestellung	21
2. Material	22
2.1 Chemikalien	22
2.2 Lösungen und Puffer	23
2.3 Geräte	26
2.4 Verbrauchsmaterialien	26
2.5 Antikörper und Liganden	27
2.6 Zelllinien	28
3. Methoden	29
3.1 Zellkulturen	29
3.1.1 Stimulierung mit TRAIL	29
3.2 Nachweis der Caspasenaktivität	30
3.2.1 Herstellung der Zellsate	30
3.2.2 Proteinbestimmung	30
3.2.3 Aufnahme der Proteine in Probenpuffer	30

3.2.4 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	31
3.2.5 Westernblot.....	32
3.2.6 FACS-Analyse (Fluorescent activated cell scan)	33
3.2.6.1 Apoptosebestimmung nach Morphologie.....	33
3.2.6.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials	34
3.2.6.3 Die Hoechst-Färbung	35
4. Ergebnisse.....	36
4.1 Apoptosemessung bei TRAIL-Behandlung und bei Bestrahlung in Jurkat- und BJAB-Zellen.....	36
4.1.1 Zeit und Dosisabhängigkeit von TRAIL	38
4.2 Die Rolle von FADD	39
4.2.1 Einfluss der Überexpression von FADD- DN auf die TRAIL-induzierte Apoptose	40
4.2.2 Einfluss der Überexpression von FADD- DN auf strahleninduzierte Apoptose	41
4.2.3 Kombinationswirkung von Bestrahlung und TRAIL- Stimulation.....	43
4.2.4 Caspasenaktivierung durch TRAIL- Behandlung, ionisierende Strahlung und Kombinationsbehandlung	45
4.3 Weitere molekulare Mechanismen bei der Kombination des TRAIL- Zelltodliganden mit ionisierender Strahlung.....	47
4.3.1 Nachweis von Caspase- 8	47
4.3.2 Rolle von Caspase-8 für die TRAIL- induzierte Apoptose, die strahleninduzierte Apoptose und die Kombinationsbehandlung	48
4.3.3 Einfluß anderer Caspasen in der Kombinationswirkung	53
5. Diskussion	55
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	55
5.2 Weitere Signaltransduktionsmechanismen von TRAIL	56
5.3 FADD- Abhängigkeit der TRAIL- Behandlung und der Kombinationsbehandlung	58
5.4 Caspase- 8 Abhängigkeit der TRAIL- Behandlung und der Kombinationsbehandlung.....	60
5.5 Erklärungsversuch für die Entstehung des Kombinationseffektes	61
5.6 TRAIL- Effekt in vivo	63

6. Zusammenfassung.....	64
6.1 Ausblick.....	64
7. Literaturverzeichnis.....	66
Danksagung.....	X
Lebenslauf.....	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Morphologische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose..5
Abbildung 2:	Apoptosemechanismus bei <i>C. elegans</i>9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der proteolytischen Caspasenaktivierung 11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des mitochondrialen PT-Kanals..... 13
Abbildung 5:	Der mitochondriale Apoptoseweg 15
Abbildung 6:	Die membranständigen TRAIL-Rezeptoren im Vergleich..... 19
Abbildung 7:	Blotaufbau als Tankblot..... 33
Abbildung 8(a):	Unbehandelte Jurkat Zellen 36
Abbildung 8(b):	Jurkat- Zellen mit 100 ng TRAIL behandelt nach 48 h gemessen 37
Abbildung 9:	Zeit- und dosisabhängige Apoptose in BJAB- Lymphomzellen... 38
Abbildung 10:	Dosis- und zeitabhängige Apoptose durch ionisierende Strahlung in BJAB- Zellen 39
Abbildung 11:	Nachweis des FADD- DN- Moleküls. 40
Abbildung 12:	Nachweis von Apoptose nach TRAIL- Stimulierung mit 25 und 100ng/ml in BJAB- Vektor und BJAB- FADD-DN-Zellen 41
Abbildung 13:	Zeitlicher Verlauf der Induktion von Apoptose durch Bestrahlung mit 5 und 10 Gy in Vektor und FADD- DN- Zellen 42
Abbildung 14:	Kombinationsbehandlung von BJAB- Vektor und BJAB- FADD- DN- Zellen mit 10 Gy und 100 ng /ml TRAIL..... 44
Abbildung 15:	Aktivierung von Caspase- 8 und dem Caspase- 8 Spaltprodukt (PARP-cleaved) in der Einzelbehandlung mit TRAIL und 10 Gray Bestrahlung, sowie in der Kombinationsbehandlung in BJAB- Vektor und BJAB- FADD- DN- Zellen 46
Abbildung 16 :	Nachweis von Procaspase 8 47
Abbildung 17:	Apoptoseinduktion nach TRAIL- Stimulus und Bestrahlung in Caspase- 8- negativen-Zellen und in deren Jurkat A3- Kontrollzellen 49
Abbildung 18:	Apoptoseinduktion nach Kombinationsbehandlung in Jurkat A3- Zellen und Caspase 8-/- Zellen 50

Abbildung 19:	Westernblotergebnisse der Einzelbehandlung (10 Gray Bestrahlung und Stimulierung mit 100 ng/mlTRAIL) und Kombinationsbehandlung Caspase- 8- negativer und Jurkat-A3-Zellen52
Abbildung 20:	Apoptoseinduktion in Jurkat A3 und Caspase 8-/- Zellen nach Einzelstimulus mit TRAIL (100ng/ml)52
Abbildung 21:	Caspase-10- Aktivierung nach Stimulierung Caspase-8 defizienter Zellen mit TRAIL- Einzelstimulierung54
Abbildung 22:	Schematische Darstellung der JNK- Aktivierung durch TRAIL....57
Abbildung 23:	Apoptosemechanismus des TRAIL-Rezeptors TRAIL-R1 und - R2.59
Abbildung 24:	Möglicher Wirkmechanismus der Kombinationstherapie von TRAIL und ionisierender Strahlung62

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Morphologische Merkmale der Apoptose und Nekrose.....	6
Tabelle 2: Biochemische Merkmale der Apoptose und Nekrose.....	7
Tabelle 3: Caspasen-Substrate.....	12
Tabelle 4 :Die Gelzusammensetzung	31

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

°C	Grad Celsius
Gy	Gray
Min	Minuten
mA	milli Ampère
ml	milliliter
µl	mikroliter
MV	Megavolt
U	Einheiten (units)
V	Volt

Aminosäuren

A	Alanin
D	Aspartat
E	Glutamat
L	Leucin
V	Valin
W	Tryptophan
X	x-beliebige Aminosäure

Weitere Abkürzungen

AIF	Apoptose induzierender Faktor
ANP	Adenin nucleotid transporter
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf- 1	apoptotic protease- activating factor 1
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
Bak-Bcl 2	antagonist/ Killer
Bax	Bcl-2- associated X Protein

Bcl-2	B- cell lymphoma Gene 2
Bcl-xl	Lange splice Variante des Bcl-X Gens
Bid	BH 3 interacting domain death antagonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
CARD	caspase recruitment domain
CCCP	Carbonylcyanid- m- chlorphenylhydrazon
CD	cluster of differentiation
CD95-L=Fas- L	CD95-Ligand=Fas ligand
Ced	caenorhabditis elegans cell death gene
CO ₂	Kohlendioxid
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
Dest.	Destilliert
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid
DR	death receptor
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGL-1	Egg laying defective gene 1
FACS	fluorescence activated cell scan
FADD	Fas- asociated protein with death domain
FAS-R	CD95 Fas Rezeptor
FCS	fetal calf serum= Fetales Klabserum
FLICE	Fas-associated death domain-like L-1-converting enzyme
FLIP	fllice inhibitory Protein (auch I- FLICE oder FLAME-1 genannt)
FSC	Forward light scatter
5-FU	5-Fluoruracil
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]tehsulfonsäure
HSP	Hitze Schock Protein =heat shock protein
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
ICE	Interleukin 1 β -converting enzyme
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNK	c-Jun- N-terminale Kinase
LET	linearer Energie Transfer

mA	milli-Ampère
µg	Mikrogramm
mRNA	messenger-ribonucleid acid
NAK	NF-kappa-Bactivating kinase
NFκB	nuclaeer factor of κB, Transkriptionsfaktor
NGF	nerve growth factor
OPG	Osteoprotegrin
PARP	poly(ADH-ribose)polymerase
PBS	phosphate buffer saline
PT-	porePermeabilityTransition Pore
Puma	p 53 upregulated modelator of apoptosis
ROS	reactive oxygen species
SAPK	stress- activated protein kinase
SDS	Sodium- Dodecyl- Sulfat
SSC	side Scatter
TEMED	N, N, N',N'- Tetramethylethylendiamid
TM	Transmembranregion
TMRE	Tetramethylrhodaminmethylester
TNF	Tumor necrosis factor receptor-associatedfactor
TRAIL	TNF- related- apoptosis- inducing ligand
TRAIL-R	Trail- Rezeptor
UV	Ultraviolett
VDAC	Voltage dependent Anion channel
XRT	Bestrahlung

1. Einleitung

Die Inzidenz bösartiger Tumore (Neuerkrankungen pro Jahr) beträgt ca. 400 pro 100.000 Einwohner. Bösartige Erkrankungen stellen somit nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache der westlichen Länder dar.

Die drei wichtigen Säulen der Tumorbehandlung bilden heutzutage: die Operation, die Strahlentherapie und die Chemo- einschließlich der Hormontherapie.

Wie bei der Chemotherapie werden die Möglichkeiten der Radioonkologie durch Resistenzmechanismen der Tumorzelle und durch Normalgewebstoleranzen eingeschränkt.

Zur Optimierung des Therapieerfolges erscheint es demzufolge sinnvoll sich genauere Einblicke in molekulare Resistenzmechanismen der Tumorzelle und strahlenbiologische Mechanismen zu erarbeiten und diese Kenntnisse möglichst in neue Therapiekonzepte umzusetzen.

1.1 Wirkung ionisierender Strahlung

Zur energiereichen Strahlung zählt: Korpuskularstrahlung (Teilchenstrahlung): α -, β -, Protonen-, Neutronen-, Elektronenstrahlung und die Photonenstrahlung (Wellenstrahlung): γ - und Röntgenstrahlung. Energiereiche Strahlung tritt in Wechselwirkung mit der durchstrahlten Materie und überträgt dabei Energie auf Atome und Moleküle. Dieser rein physikalische Vorgang läuft sehr schnell ab, und die von außen zugeführte nicht vorgesehene Energie kann biologische Systeme desorganisieren.

Die Wege, die vom physikalischen Primärereignis zum biologischen Effekt führen, sind unterschiedlich: entweder sehr kurz, wenn die Energiedeposition unmittelbar im Biomolekül erfolgt, oder - und das ist meistens der Fall - bedeutend länger, indem verschiedene Zwischenschritte durchlaufen werden.

Entsprechend unterscheidet man zwischen der direkten und indirekten

Strahlenwirkung (1).

Direkte Strahlenwirkung :

Sie ist der dominierende Prozess bei Strahlung mit hohem linearem Energietransfer (LET), z.B. schweren Ionen, Neutronen, α - Teilchen. Dabei verursacht die ionisierende Strahlung eine direkte Ionisierung und Inaktivierung organischer Moleküle der Zelle (z.B. Enzyme, Membranen, DNA).

Indirekte Strahlenwirkung :

Die Strahlung interagiert zunächst mit Wasser. Dabei entstehen freie Wasserradikale. Diese diffundieren weit genug, um das kritische Biomolekül erreichen und schädigen zu können. Energieabsorption und Bioeffekt erfolgen also in unterschiedlichen Strukturen. Die indirekte Strahlenwirkung ist der dominierende Vorgang bei Strahlungen mit niedriger LET, sog. locker ionisierender Strahlung. Es sind dies die Röntgen-, Gamma- und Elektronenstrahlung, die in der Klinik eingesetzt werden, sie wirken zu 65-70 % auf indirektem Wege.

Kritischstes Zielmolekül direkter und indirekter Strahlenwirkung ist die DNA der Zelle. Insgesamt lassen sich folgende Schäden an der DNA experimentell feststellen:

- Basenmodifikationen und -verluste
- Einzelstrangbrüche
- Doppelstrangbrüche
- DNA-Vernetzungen (DNA-DNA-Crosslinks)
- DNA-Proteinvernetzungen (Crosslinks)
- Bulky Lesions (Mehrfachereignisse, "locally multiply damaged sites", LMDS)

Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy Röntgenstrahlung rechnet man mit:

- ca. 1000-2000 Basenveränderungen
- ca. 500-1000 Einzelstrangbrüche
- ca. 50 Doppelstrangbrüchen.

Bisher teilte man den Doppelstrangbrüchen die entscheidende Rolle beim Strahlentod der Zelle zu (2). Es werden der Zelle jedoch weitaus mehr DNA-

Schäden bei einer therapeutischen Bestrahlung von 2 Gray zuteil, ohne dass diese zum Zelltod führt (3). Folglich muss die Zelle gesteuerte Reparatursysteme besitzen welche die Strahlenschäden beseitigen kann.

Verbleibende Mutationen der Zelle können nach Bestrahlung zur malignen Transformation der Zelle oder zum Zelltod führen.

1.2 Apoptose

Im kurativen Behandlungskonzept von Tumorerkrankungen spielt die Strahlentherapie eine wesentliche Rolle. Sie kann allein oder in Verbindung mit Operation und Chemotherapie zur Heilung führen. Ihr Ziel ist die Abtötung von Tumorzellen unter größtmöglicher Schonung des Normalgewebes. Bezüglich des Zelltodes können prinzipiell zwei Formen unterschieden werden: Die Apoptose und die Nekrose. Die passive Zelltodreaktion kann als Nekrose beschrieben werden. Die Apoptose hingegen ist ein programmierter, geordneter und genetisch festgelegter Mechanismus der Zelle.

Die Morphologie der Apoptose und Nekrose wurde schon vor 114 Jahren vom Pathologen Councilman (4) beschrieben, welcher sich mit Lebererkrankungen befasste. Beschrieben wurden damals die Einzelzellnekrosen und azidophilen und hyalinen Einschlusskörperchen in der Leber.

COUNCILMAN entdeckte bei Patienten, welche an Gelbsucht erkrankt waren, hyaline Einschlusskörperchen. Diese erhielten seinen Namen: so genannte Councilmankörperchen.

Bis vor kurzem betrachtete man diese als nekrotische Hepatozyten. Doch interessanterweise beobachtete man deren Phagozytose durch Makrophagen, ein für die Nekrose ungewöhnlicher Prozess. Erst 1972 führten KERR et al. (5) den Begriff der Apoptose ein. Das Wort stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Abfallen der Blätter von den Bäumen. Selbiges Bild ergibt sich aus der mikroskopischen Betrachtung der fragmentierten Kern- DNA apoptotischer Zellen. Ein Charakteristikum diese Zelltodform ist die Attraktion von Makrophagen und die Phagozytose durch selbige (6).

Die Apoptose (der programmierte Selbstmordmechanismus der Zelle) ist ein ubiquitäres biologisches Prinzip zur Zellzahlregulation, welches sowohl in der Embryogenese, als auch im ausgewachsenen Organismus wirkt. Durch apoptotische Vorgänge kann die Homöostase von Geweben aufrechterhalten werden. So kann der Zuwachs an Zellen infolge Zellteilung kompensiert werden, indem funktionsunfähige und ältere Zellen gezielt eliminiert werden (7).

Im Immunsystem kann ebenfalls das Phänomen der Apoptose beobachtet werden, z.B. bei der Elimination autoreaktiver T- und B-Lymphozyten oder bei der Selektion bestimmter Zellen im Thymus (8). Mittels Apoptosevorgängen ist es auch möglich geschädigte Zellen zu vernichten, welche die Tendenz besitzen Mutationen zu kumulieren und zu Tumorzellen zu entarten.

Gerät der Mechanismus der Apoptose aus den Fugen, so kann dies zu onkologischen Erkrankungen, neurodegenerativen und immunodefizitären Störungen führen (9, 10,11).

In folgender Zeichnung und Tabelle sind die wichtigsten morphologischen und biochemischen Unterschiede von Apoptose und Nekrose erläutert.

Zelltodmorphologien

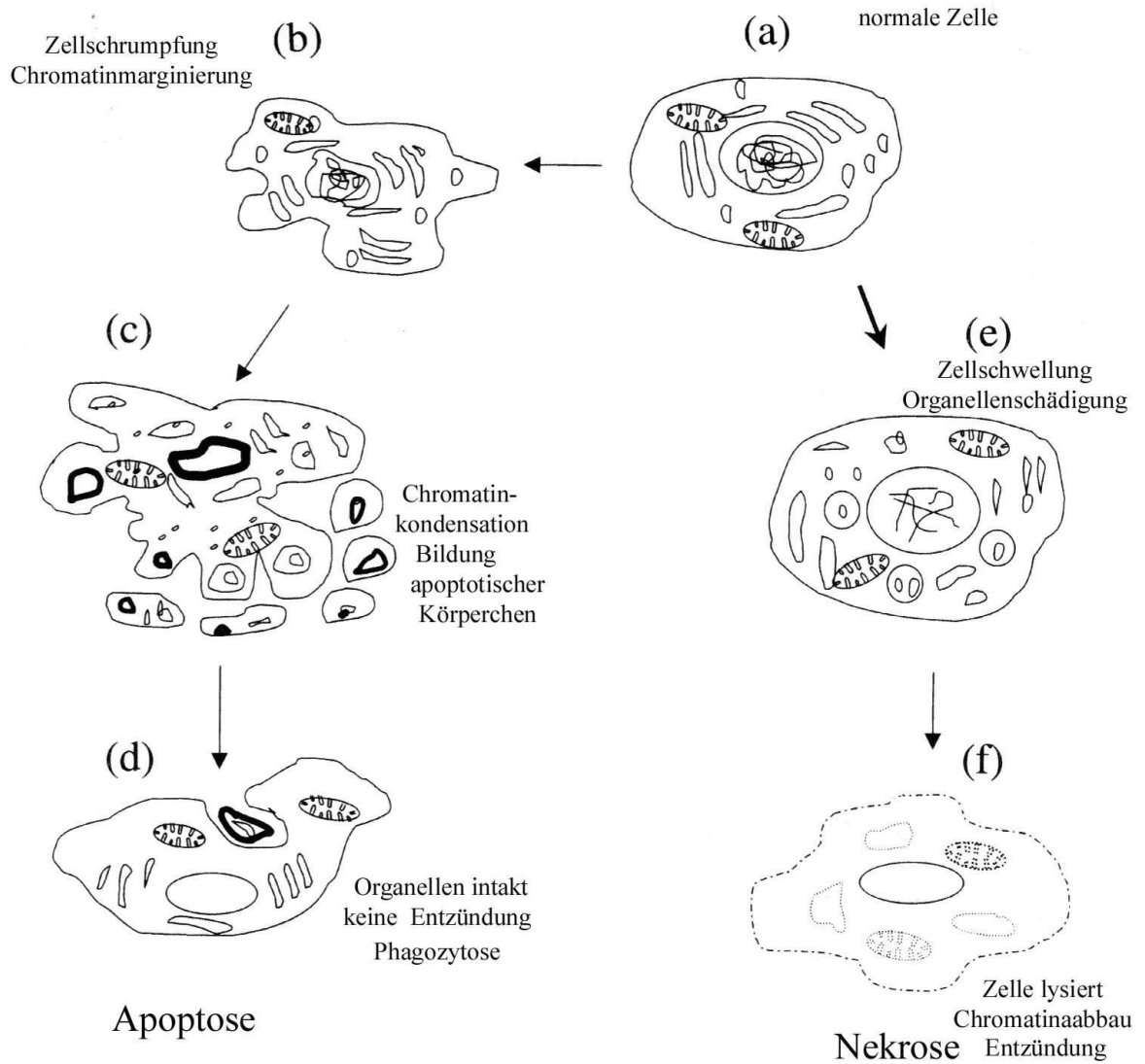


Abbildung 1 (nach Studzinski 1999) (12): Morphologische Unterschiede zwischen Apoptose (links) und Nekrose (rechts).

Tabelle 1: Morphologische Merkmale der Apoptose und Nekrose

	Apoptose	Nekrose
	physiologischer, geordneter Vorgang Auslöser: • endogen • exogen	unphysiologischer Vorgang Auslöser sind externe Schädigungen wie Hypoxie und Hyperthermie
Morphologische Kriterien		
1. Nucleus	Pyknose und Karyorhexis Chromatinkondensation	Karyolyse Chromatinverlust
2. Zytoplasmatische Organellen	morphologisch intakt	zerstört
3. Zellmembran	Apoptotic bodies (Vesikelbildung), „blebbing“ = Bildung von Membranausstülpungen, bei der die Membran intakt bleibt	Integritätsverlust
4. Zellvolumen	Zellschrumpfung	Zellschwellung
5. Im Gewebe	Einzelne Zellen betroffen	Zellgruppen betroffen
6. Gewebsantwort	Keine	Entzündung

Tabelle 2: Biochemische Merkmale der Apoptose und Nekrose

	Apoptose	Nekrose
1. DNA-Abbau	geregelter Prozess, Fragmentierung in 50-300 kb Stücke typische DNA- Leitern im Agarosegel	DNA- Abbau erfolgt zu späterem Zeitpunkt Schmieriges DNA-Bandenmuster im Agarosegel
2. Genexpression	für den Prozess benötigt	Nicht notwendig
3.mitochondrialer DNA-Schaden	bleibt aus	tritt früh ein
4. Membranfunktion	Intakt	Funktionsverlust
5.Intrazelluläres Milieu		
a. ph	leichte Azidität (pH 6,4)	sauer
b. Ca ²⁺	oftmals intrazellulär erhöht	immer i.z. erhöht
c. Na ⁺ /K ⁺ ATPase	oft intakt	defekt
d. ATP	verbraucht	verbraucht

Exogene und endogene Stimuli bestimmen das Schicksal einer Zelle. Zu den apoptoseauslösenden Mechanismen zählen im Folgenden:

Liganden, welche über Zelltodrezeptoren agieren (13, 14, 15), Granzym B (16), Glukokortikoide, Zytostatika, Hitzeschock, γ -Strahlung, UV-Strahlung, Bax, Bid, Bad, Bak (17, 18), Ceramide, Staurosporin, Onkogen Myc, Wachstumsfaktorentzug und Tumorsuppressorgen p53.

Die Zelle verfügt über Mechanismen, welche die Apoptose verhindern können. Dazu zählen:

- Proteaseinhibitoren: IAP-Familie (19) (c-IAP-1, c-IAP-2, N-IAP, x-AIP), diese agieren als Pseudosubstrate von Caspasen und regulieren deren Aktivität hinunter
- Pseudocaspasen: c-FLIP: ein kompetitiver Antagonist von Caspase-8

intrazellulären FADD-Molekül der Rezeptoren CD-95/Fas/ APO-1, somit kann die Caspasenkaskade gar nicht erst aktiviert werden (20)

- CED-9- Homologe : Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w (18)
- Granulozyten- Kolonie- stimulierender- Faktor (21)
- Hitzeschockproteine / HSP70 (22): HSP 70 kann Thymozyten vor strahleninduzierter Apoptose schützen

1.2.1 Die Komponenten des apoptotischen Programms

1.2.1.1 Caenorhabditis elegans

Die Proteasenaktivierung ist eines der wichtigsten biochemischen Kennzeichen der Apoptose. Die Proteasen übernehmen bei der Apoptose die Spaltung unzähliger nukleärer und cytoplasmatischer Proteine. Am Modell des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* konnten grundlegende Mechanismen der Apoptose untersucht werden (23).

Caenorhabditis elegans verfügt über drei essentielle Zelltodgene (Caenorhabditis elegans death gene): CED- 3, CED- 4, CED- 9.

CED- 3 und CED- 4 sind für die Ausführung des Zelltodprogramms zuständig. Eine Aktivierung von CED-9 kann eine inhibitorische Wirkung auf die Apoptose ausüben. Eine Überexpression von CED- 3 Genen resultiert in Zelltod mit apoptotischer Morphologie.

Im Säugetierreich findet man den CEDs homologe Proteine, deren Funktion in den Kapiteln 1.2.1.3 und 1.2.1.4 erläutert werden:

- CED- 4 entspricht Apaf- 1 (apoptosis protease activating factor) (24)
- CED- 3 entspricht den Caspasen (25)
- CED- 9 entspricht den BCL- 2 Proteinen (26)

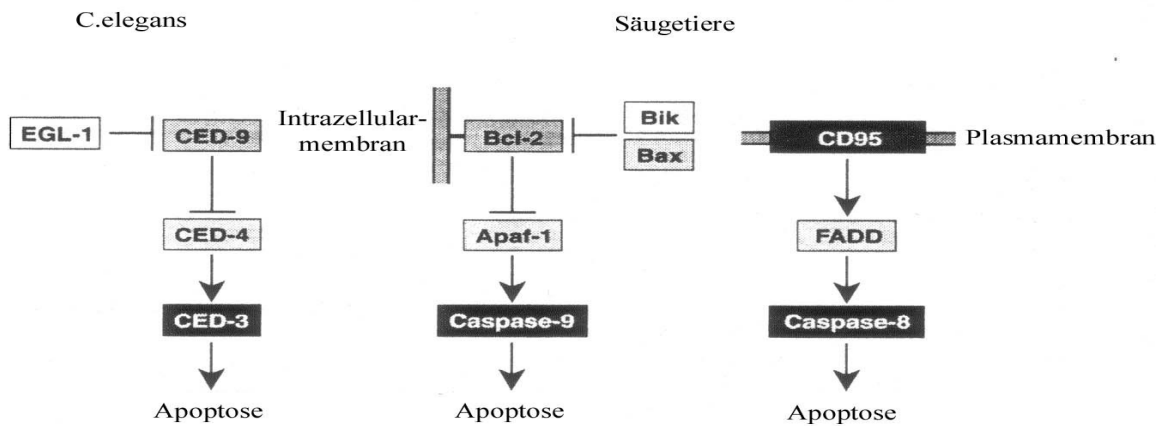


Abbildung 2: nach J. Adams und S. Cory (1998) (27) Links im Bild: Apoptosemechanismus bei *C. elegans*. In der Mitte und rechts: der Apoptosemechanismus für Säugetiere. Der Bcl-2- Apoptoseweg (hier: Mitte des Bildes) kann durch zytotoxische Stimuli (Zytokinenzug, Kortison, DNA-Schädigung oder Staurosporin) ausgelöst werden. Rechts im Bild: der CD-95-Zelltodrezeptor- Mechanismus

1.2.1.2 Caspasen, die Effektoren der Apoptose

Caspasen (cystein asparat protease) sind Cysteinproteasen, die eine zentrale Rolle im Apoptose- Signaltransduktionsweg einnehmen. Sie sind in der Lage verschiedenste Proteine zu spalten. Caspasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum einen Cystein- Rest und spalten ihre Substrate nach einem bestimmten Erkennungsmuster von 4 Aminosäuresequenzen (nach Aspartat:-XXXD), X steht für eine beliebige Aminosäure, D steht für Aspartat (28). Die Caspasen werden als inaktive Proenzyme gebildet.

Ihr Aufbau setzt sich wie folgt zusammen:

1. Prodomäne: sie bildet die Verbindung zwischen Zelltodstimulus (z.B. nach Chemotherapie) und Caspasenaktivierung
2. lange Untereinheit
3. kurze Untereinheit.

Caspasen können Caspasen selbst oder auch andere Caspasen aktivieren. Die

proteolytisch aktivierte Caspasenform besteht aus zwei Heterodimeren/ zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (29, 30, 31).

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt in hierarchischer Ordnung, sie werden in zwei Gruppen eingeteilt: die Aktivatorcaspasen und die Effektorcaspasen.

Die Aktivatorcaspasen verfügen über eine lange Prodomäne (Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-10). Casp-8 und-9 können sich selbst aktivieren (Autocleavage).

Die Effektorcaspasen mit kurzen Prodomänen (Caspase-3, Caspase-7, Caspase-6) spalten hingegen Substrate, die zur Finalisierung des Zelltodes führen.

Eine weitere geläufige Form der Caspaseneinteilung ist die nach Substratspezifität: (32, 33)

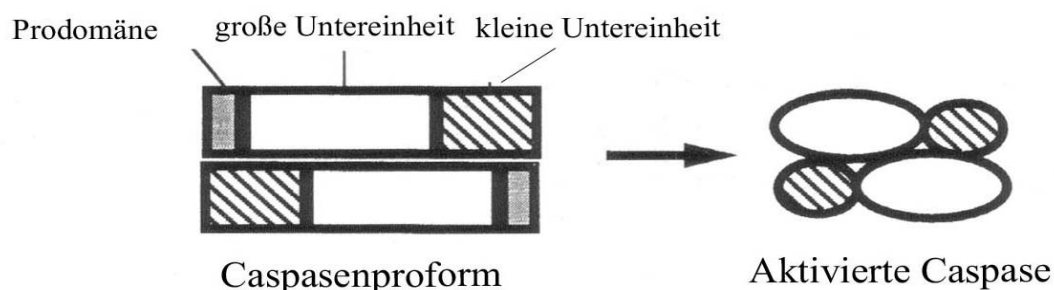
Caspasengruppe mit Erkennungssequenz- WEXD : Casp-1, Casp-4, Casp-5.

Caspasengruppe mit Erkennungssequenz- DEXD : Casp-2, Casp-3, Casp-7 und CED.

Caspasengruppe mit Erkennungssequenz- L-/VEXD : Casp-6, Casp-8 und Casp-9.

Insgesamt sind 14 Caspasen bekannt, deren Aufgabe von Umsetzung des apoptotischen Programms bis hin zur Interleukinprozessierung und Immunregulation (caspase-1-like-protease) reicht. Dadurch sind Caspasen entscheidend an der Regulation der Gewebshomöostase sowie Embryogenese beteiligt. So ist eindrucksvoll am Beispiel der Caspase-8 knockout-Maus bewiesen worden, dass diese in utero nicht überlebt. Dies ist auf eine gestörte Myokardentwicklung zurückzuführen (34).

Caspase-3 knockout-Mäuse imponieren durch neurodegenerative Erscheinungen mit erhöhter postmitotischer Neuronenzahl (35).



Initiatorcaspasen	Effektorcaspasen
Todesrezeptorassoziiert : Caspase 8,10 mglw.2 Intrinsischer Weg : Caspase 3	Caspase 3,6, und 7

Abbildung 3: (nach Studzinski et al., 1999) (36) Schematische Darstellung der proteolytischen Caspasenaktivierung. Die Caspasen besitzen drei Untereinheiten. Die Spaltung der inaktiven Caspase führt zur proteolytisch aktiven Caspase, wobei sowohl die Prodomäne als auch die kleinen Untereinheiten abgespalten werden. Es entsteht ein Heterotetramer. Die Caspasen mit langer Prodomäne wirken als Aktivatorcaspasen an der Spitze der Apoptosenkaskade. Caspasen mit kleiner Untereinheit induzieren die Spaltung von Substraten, die zur Finalisierung der Apoptose führen.

Tabelle 3: Caspasen-Substrate (nach C. Stroh und K. Schulze Osthoff 1998)(37)

Cytoskelett- und Strukturproteine		Proteinkinasen in der Signaltransduktion	
Protein Aktin β-Catenin Fodrin Gelsolin Gas-2 Keratin 18,19 Lamin Plakoglobin	Funktion Cytoskelettprotein Zelladhäsion Kortikales Cytoskelett Aktinbindendes Protein Mikrofilamentorganisation Intermediärfilamente Kernhülle Zelladhäsion	Protein Calmodulin-abhängige Kinase Fokale Adhäsionskinase MEKK-1 Proteinkinasase Cδ und θ MST/ksr p-21 aktivierte Kinase PITSI, RF-Kinase	Funktion Signaltransduktion Zelladhäsion MAP-Kinase-Weg Signaltransduktion Zellzyklusregulation MAP-Kinase-Weg Zellzyklus
Zellzyklus und Replikation		Signalvermittler	
Molekül Cdc27 Cyclin A DNA-Replikationskomplex C MCM3 Replikationsfaktor MDM2/HDM2 NuMA p21 p27 Retinoblastomprotein Topoisomerase-1 Wee 1	Funktion Zellzyklus Zellzyklus DNA-Replikation DNA-Replikation p53-Inhibitor Mitoseapparat Cdk2 Inhibitor Cdk- Inhibitor Repressorkomplexbildung DNA-replikation Kinase, Cdc2-Inhibitor	Molekül Bcl-2 und Bcl-xL Bid cytosolisches PLA2 D4 GTP Procaspasen Proteinphosphatase 2A p28 Bap 31 D4-GDP dissociation Inhibitor (D4-GDI) Ras GAP	Funktion Apoptoseinhibitoren Apoptoseaktivator Phospholipidmetabolismus Inhibitor der kleinen GTP- asen Apoptosekaskade Signaltransduktion Bcl-2 Adaptor des ER Inhibitor von kleinen GTP- asen, Rho-Weg Ras-GTP-ase aktivierendes Protein
Transkription und Translation		Sonstige Substrate	
Molekül hnRNP (heteronukleäre, ribonukleäre Proteine) IκB-α NF-κB (p50,p65) STAT-1 SREBP (sterol-regulatory element binding proteins) Sp-1 U1-70 kd sRNP h-RNP C1/2 (heteronukleär, ribonukleäre s Protein)	Funktion RNA- Splicing NF-κB Inhibitor Zytokine und Antiapoptosegene Signaltransduktion von Zytokinen Cholesterinmetabolismus Transkriptionsfaktor RNA-Splicing Splizen von m-RNA	Molekül Atrophin-1 Ataxin-3 APC-protein Calpastatin Huntingtin hsp-90 Presenilin Rapaptin-5 Nedd 4	Funktion Neurodegeneration Neurodegeneration Adenomatöse Polyposis Coli Gen Calpaininhibitor Huntingtonerkrankung Hitzeschockprotein Alzheimererkrankung Endosomenfusion Ubiquitin-Proteinligase
DNA-Spaltung und DNA-Reparatur		Zytokinorstufen	
Molekül DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) Poly-ADP-Ribose- Polymerase (PARP) Inhibitoren der Caspasen- aktivierten DNase	Funktion DNA-Reparatur DNA-Reparatur DNA-Spaltung	Molekül Prointerleukin 1β Prointerleukin 16 Prointerleukin 8	Funktion Immunregulation Immunregulation Immunregulation

1.2.1.3 Der mitochondriale Apoptoseweg

Es werden zwei Apoptosemechanismen unterschieden. 1. der zelltodrezeptorvermittelte Weg und 2. der Cytochrom-c abhängige mitochondriale Mechanismus.

Die durch DNA- Schäden induzierte Apoptose impliziert ein intaktes p- 53 System (38). p53/ auch als Tumorsupressorgen bekannt, bewirkt die Transkription des Bax Moleküls (39). Bax ist ein Protein der großen Bcl-2 Proteinfamilie.

Bax wiederum vermittelt die Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium.

Der genaue Mechanismus der Cytochrom-c Freisetzung ist noch umstritten. Einige Autoren führen den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, ($\Delta\psi$ m) (40) auf die Bildung eines so genannten PT- Kanals (so genannte „permeability transition pore“) zurück (41). Öffnet sich die PT- Pore, kommt es zu einem Protoneneinstrom, mit Folge der osmotischen Schwellung des Mitochondriums und Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (42).

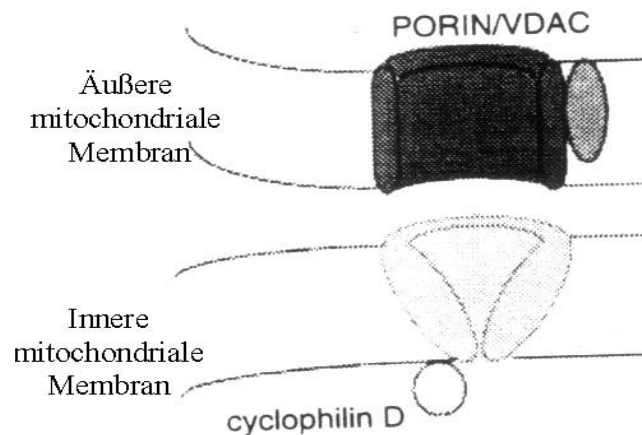


Abbildung 4: (nach D.R. Green und J.C. Reed, 1998) (43) Schematische Darstellung des mitochondrialen PT-Kanals, bestehend aus dem Transporterprotein ANT, dem Kanalprotein VADC und Cyclophilin.

Andere Modelle zeigen, dass eine Cytochrom-c Freisetzung und Caspasenaktivierung vor Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials möglich ist und damit die Öffnung des PT- Kanals am Ende der Apoptosenkaskade erfolgt (44, 45).

Letztendlich bewirkt die Cytochrom-c Freisetzung die Bildung des so genannten Apoptosoms (46), ein Komplex aus:

- Cytochrom-c
- Apaf- 1 (das Homologe zu CED- 4)
- und Procaspase- 9 (das Homologe zu CED- 3).

Das Adapterprotein Apaf- 1 rekrutiert die Procaspase- 9 an ihrer CARD („Caspase Reuitement Domain“) und prozessiert diese in ihre aktive Caspase- 9- Form. Caspase- 9 veranlasst die Aktivierung der Caspasenkaskade, welche den apoptotischen Zelltod initiiert.

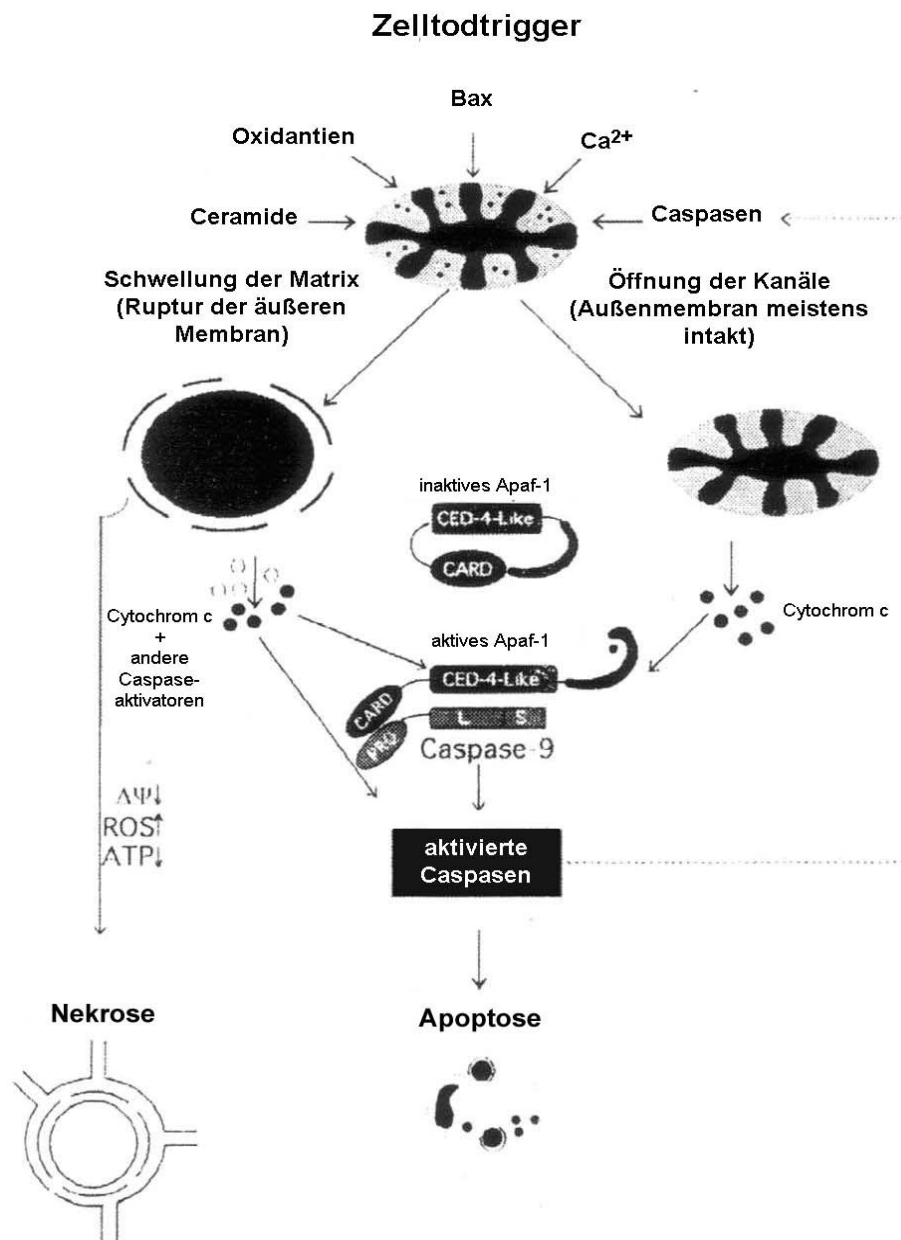


Abbildung 5 (nach D.R. Green und J.C. Reed, 1998)(43) Der mitochondriale Apoptoseweg. Zelltodtrigger wie Oxidantien, Bax und andere bewirken entweder eine mitochondriale Membranschwellung und -ruptur, oder eine Öffnung von Kanälen. Daraufhin erfolgt die Freisetzung von Cytochrom-c und die Bildung des Apoptosoms. Die aktivierte Caspase 9 initiiert letztendlich die Caspasenkaskade, was zum apoptotischen Zelltod führt.

1.2.1.4 Bcl-2, hemmendes Molekül der mitochondrialen Apoptose

Ein dem CED-9 vergleichbares Molekül in Säugetierzellen ist das Bcl-2 Protein. Bcl-2 wurde zuerst in B-Zelllymphomen entdeckt (B-cell-lymphoma/leucemia). Mittlerweile sind 15 Mitglieder der Bcl-2 Familie bekannt. Diese werden in pro- und antiapoptotische Moleküle unterschieden (27). Als Onkoprotein verhindert Bcl-2 die Einleitung des apoptotischen Programms und schützt Zellen vor folgenden Zelltodmediatoren: Dexamethason, Staurosporin, Wachstumsfaktorentzug, γ - und UV-Strahlung (47-51). Seine relative Konzentration kann für das Überleben oder die Apoptose der Zelle entscheidend sein (52).

Bcl-2 ist zellulär am endoplasmatischen Retikulum, an der mitochondrialen zytoplasmatischen Membran und an der Kernhülle lokalisiert und hemmt die Cytochrom-c Freisetzung aus dem Mitochondrium (43, 53, 54). Es konnte gezeigt werden, dass die strahleninduzierte Apoptose sowohl durch endoplasmatisch, als auch mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 modifiziert werden kann. (55).

Bcl-2 schützt nicht vollständig vor allen Zelltodstimuli, z.B. kann Bcl-2 nicht die CD-95 induzierte Apoptose verhindern. Denn CD-95 Stimulation erfolgt über Zelltodrezeptoren und somit unabhängig von der mitochondrialen Apoptose auf die Bcl-2 Einfluß übt (56-58).

1.2.1.5 Der zelltodrezeptor-vermittelte Apoptoseweg

Zytokine der TNF-Familie regulieren die Apoptose über Zelltodrezeptoren. Es sind mittlerweile verschiedenste Zelltodrezeptoren identifiziert:

- Fas/APO-1/CD-95 (59, 60) agonistische Rezeptoren
- TNFR-1 (61) agonistische Rezeptoren
- DR3/WSL-1/ TRAMP (62-65) agonistische Rezeptoren
- und die TRAIL-Rezeptoren: TRAIL R1, TRAIL R2 TRAIL R3, TRAIL R4 und OPG (siehe Kapitel 1.2.1.6).

Der bestuntersuchte Rezeptor ist der Fas-Rezeptor, welcher durch den Liganden

Fas- L (auch CD-95-L/APO-1L genannt) aktiviert wird. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Assoziation von FADD und der intrazellulären „Death Domain“ des Zelltodrezeptors (66-68). Beide Moleküle gehören zum so genannten DISC-Komplex (Death Inducing Signaling Complex).

FADD besitzt eine Todeseffektordomäne (DED, death effector domain)(66-68), welche an die DED von Caspase-8 bindet (69-71). Die hiermit aktivierte Caspase-8 leitet die proteolytische Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase-3 ein (72). Diese ist ihrerseits für die Spaltung verschiedenster zellulärer Proteine zuständig. Es konnte aufgezeigt werden, dass neben diesem Modell ein weiterer Signaltransduktionsweg durch Zelltodrezeptoren ermöglicht werden kann. Caspase- 8 führt ebenfalls zur Bid- Aktivierung (73-75). Bid wird gespalten, letztendlich wird die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom-c induziert. Somit findet ein „cross talk“ zwischen der mitochondrialen und der rezeptorvermittelten Apoptose statt. In welcher Weise die Cytochrom-c Freisetzung erfolgt, ist noch ungeklärt; Fakt ist jedoch, dass diese durch Bcl- 2 und Bcl- xl reguliert wird (76, 77). In Zellen mit geringer initialer Caspasen- 8 Aktivierung, kann der direkte Effekt von Caspase-8 auf Caspase-3 durch den mitochondrialen Apoptosemechanismus über Bid amplifiziert werden.

1.2.1.6 TRAIL-Rezeptoren

Neben Fas /CD-95-L konnte ein weiterer Apoptose induzierender Ligand identifiziert werden: TNF- related-apoptosis-inducing ligand/ TRAIL (78-80).

Die Signaltransduktionswege von TRAIL und CD-95- L sind ähnlich. Im Gegensatz zu CD –95-L, dessen Effekt über einen Rezeptor (CD-95/ Fas / APO-1) vermittelt wird, konnten bisher fünf TRAIL-Rezeptoren identifiziert werden:

TRAIL R1/DR4/APO-2L (81)	agonistischer Rezeptor
TRAIL R2/DR5 (82-84)	agonistischer Rezeptor
TRAIL R3/TRID/DcR1	(TRAIL- receptor without intracellular domain)

TRAIL R4/DcR2 (decoy receptor 2) („truncated”)	(TRAIL Rezeptor mit inkompletter zytoplasmatischer Todesdomäne
OPG /Osteoprotegerin (85, 86)	antagonistischer Rezeptor /decoy receptor in fibroblastenähnlichen Synovialzellen, dieser Rezeptor ist in löslicher Form in den Synovialzellen enthalten

Alle Rezeptoren, außer OPG (löslicher Rezeptor) besitzen eine extrazelluläre TRAIL- Bindungsdomäne (87), sowie eine hydrophobe transmembranäre Domäne. Die beiden Rezeptoren: TRAIL- R1 und TRAIL- R2 können das Apoptosesignal in die Zelle weiterleiten (88- 90); beide besitzen eine death domain- Region, eine für die Apoptoseinduktion unabdingbare Voraussetzung (61, 91).

TRAIL- R3,- R4 und Osteoprotegerin sind nicht in der Lage apoptoseinduzierend zu wirken. Dies ist darauf zurückzuführen, dass dem TRAIL- R3 die komplette intrazelluläre Todesdomäne fehlt. Bei TRAIL- R4 ist dieses intrazelluläre Molekül nur inkomplett vorhanden (88, 92).

Die Entdeckung der fünf unterschiedlichen TRAIL- Rezeptoren legte die Vermutung nahe, dass eine unterschiedliche Verteilung dieser Rezeptoren ein möglicher Mechanismus für TRAIL- Resistenz und Empfindlichkeit darstellen könnte. So lokalisierte man die m- RNA von TRAIL- R3 und TRAIL- R4 in normalen Gewebszellen, wobei Tumorzellen völlig frei von diesen Rezeptoren waren (67, 69, 93).

Andere Autoren warnen vor einer Vereinfachung der TRAIL- Mechanismen, so ist die Expression von TRAIL-R3 in verschiedensten Körpergeweben variabel. Außerdem scheint laut DEGLI- ESPOSTI et al. der auf die Apoptose inhibitorische Effekt von TRAIL-R3 zeitlich begrenzt und in seiner Aktivität inkomplett zu erfolgen (92).

Intrazellulären Regulatoren der Apoptose kommt zudem noch eine nicht unerhebliche Rolle in der Regulation der TRAIL- Rezeptorinduzierten Apoptose zu. TRAIL-R4 vermag NF- κ B zu aktivieren (92) und dieser Transkriptionsfaktor

wiederum die Synthese antiapoptotischer Proteine.

Zellen mit höheren FLIP-Spiegeln (FLIP= flice inhibiting protein) sind demnach resistenter gegenüber TRAIL- Stimulus (94, 95).

Folgende Abbildung verdeutlicht nochmals den Aufbau der vier bekannten membranständigen TRAIL-Rezeptoren.

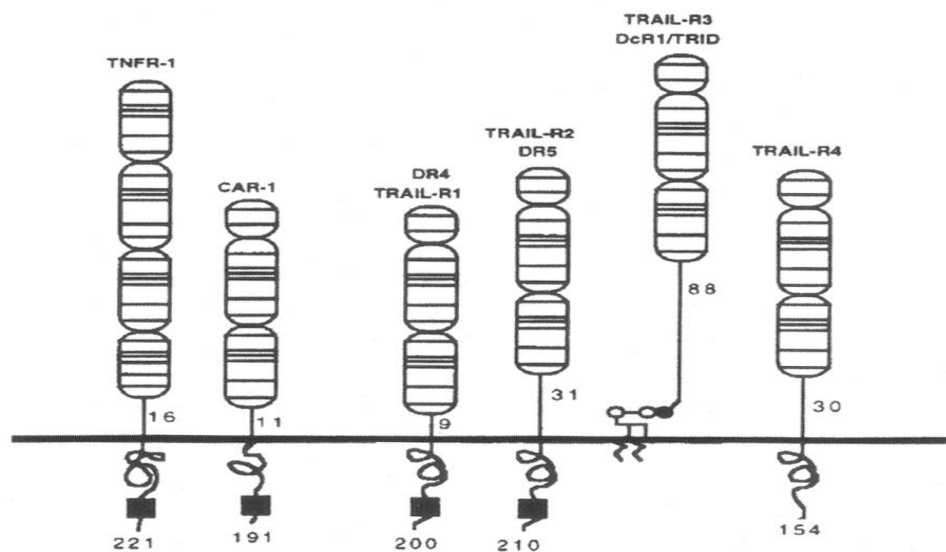


Abbildung 6: (nach Degli-Esposti et al. 1997) (92) Die membranständigen TRAIL-Rezeptoren im Vergleich. Der intrazellulären Todesdomäne entspricht das kleine schwarze Rechteck im Bild. Die Rezeptoren DCR-1 und TRAIL-R4 besitzen keine oder nur eine unvollständige Todesdomäne.

1.3 Therapeutische Nutzung von TRAIL

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Fas- Ligand zur tumorzellspezifischen Apoptose führt, schien ein neues potentes Tumorthapeutikum gefunden zu sein. Allerdings führte im Tiermodell die Fas Liganden- Injektion zu einer entzündlichen Gewebsreaktion, einem septischen Schock vergleichbar (96).

Dieser Effekt wurde auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B in vaskulären Endothelzellen und in Makrophagen zurückgeführt (97). Im Mausmodell scheiterte der Einsatz von Fas- Ligand in der Klinik aufgrund der bedrohlichen hepatotoxischen Nebenwirkungen. Dieser Effekt wird auf die hohe Fas Rezeptor- Expression in Hepatozyten zurückgeführt (98).

Demzufolge ist die Applikation von Fas Ligand in der Tumorthherapie aufgrund der erhöhten hepatotoxischen Wirkung nicht möglich.

Umso interessanter schien die Entdeckung von TRAIL als zelltodrezeptorvermittelndes System. Denn die Nebenwirkungen waren bis dahin noch nicht bekannt.

ASHKENAZI et al. demonstrierte das therapeutische Potential von TRAIL an verschiedensten Tumorzelllinien. Mäuse mit einem Tumorexograft, welche mit TRAIL behandelt wurden zeigten eine geringere Tumorprogression als unbehandelte Tiere auf. TRAIL wirkte apoptoseinduzierend und lebensverlängernd (99).

In normalen Körperzellen ließ sich nach TRAIL- Applikation auch keine gewebs- und hepatotoxische Wirkung, wie bei Fas- Ligand- Gabe, beobachten (100).

Die in einer anderen Studie beobachtete hepatotoxische Wirkung von TRAIL (101) konnte erfreulicherweise auf eine biochemische Präparation der Rekombinanten Version und nicht auf das TRAIL- Molekül selbst zurückgeführt werden (102).

Daher ist TRAIL weiterhin ein viel versprechendes Agens für die Tumorthherapie. Seit September 2004 ist das so genannte TRAIL/Apo2L auch Gegenstand klinischer Phase I/II Studien (mündliche Mitteilung von Avi ASHKENAZI).

1.4 Fragestellung

TRAIL/APO2-L induziert Apoptose in humanen Tumorzelllinien und scheint weniger zytotoxische und hepatotoxische Nebenwirkungen zu haben, wie sein verwandter Ligand CD-95L. In Vorarbeiten konnten supraditive Effekte der Kombination von TRAIL/APO2-L mit DNA- schädigender ionisierender Strahlung demonstriert werden (103).

Ziel vorliegender Doktorarbeit war es, essentielle molekulare Komponenten für die Kombinationswirkung zu identifizieren.

1. Dazu sollte geklärt werden, inwiefern Caspase-8 für die Kombinationseffekt von TRAIL und ionisierender Strahlung verantwortlich ist. Hierzu wurden Caspase-8 negative Zellen hinsichtlich ihrer Apoptoseinduktion mittels Durchflußzytometrie und Westernblot untersucht.
2. Ebenfalls wurde das FADD- Molekül auf seine Wirkung in der Kombinationsbehandlung getestet. Dazu dienten BJAB- Zellen (Burkittlymphomzellen) mit einem FADD dominant negativen Molekül (BJAB-FADD- DN-Zellen).

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth/ Karlsruhe, Deutschland
Aprotein Leupeptin	Sigma/ München, Deutschland
APS	Roth/ Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma/München, Deutschland
CCCP	Sigma/ München, Deutschland
Deoxycholat	Sigma/ München, Deutschland
DMSO	Sigma/ München, Deutschland
FCS	Biochrom/ Berlin, Deutschland
G418 (Genicitin)	Gibco Life Technologies UK
HEPES	Sigma/ München Deutschland
Hoechst 33342	Calbiochem/ Bad Soden und Schwalbach, Deutschland
Lymphoprep (Ficollösung)	Nycomed/ Wien, Österreich
Methanol	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Penicillin Streptomycin	Biochrom/ Berlin, Deutschland
Ponceau S	Sigma/ München, Deutschland
Proteinlösung (Proteinassay)	BioRad/ München, Deutschland
Rainbowmarker	Amersham/ Buckinghamshire UK

RPMI- Medium	Gibco/ Life Technologies UK
SDS	Sigma/ München, Deutschland
SDS- Puffer	Roth/ Karlsruhe, Deutschland
B- Mercaptoethanol	Sigma/ München, Deutschland

TEMED	Roth/ Karlsruhe Deutschland
TMRE	Mobitech/
Triton	Sigma/ München, Deutschland
Tropix	Biorad/ München, Deutschland
Trypanblau	Sigma/ München, Deutschland
Tween 20	Sigma/ München, Deutschland

2.2 Lösungen und Puffer

PBS
8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g NaHPO ₄
0,2 g KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml Aqua dest.
ph 7,4

TBS
1,57 g Tris-HCL
8,76 g Na Cl
ad 1000 ml aqua dest.
ph 8,0

TBS-Triton
TBS + 0,02 % Triton

TBS-Tween
TBS + 0,05 % Tween 20

25 Mol HEPES
0,1 % SDS
0,5 % Desoxycholat
1 % Triton
10 mMol EDTA
10 mMol Napp- Sodiumpyrophosphat
10 mMol NaF
125 mMol NaCl
Bei Lysatherstellung kurz davor Zugabe von 20 µg/ml Aprotein-Leupeptin.

Probenpuffer
2,0 ml Glycerin
2,0 ml 10 %SDS
0,025 g Bromphenolblau
2,5 ml Sammelpuffer
Ad 9,5 ml aqua dest.

Transferpuffer (Westernblot)
14,4 g Glycerin
3,03 g Tris-Base
0,025-0,1 % SDS
200 ml Methanol
Ad 1000 ml aqua dest.
ph 8,3

Trennpuffer
18,17 g Trisbase
4 ml 10 % SDS
Ad 100 ml aqua dest.
ph 8,8

Sammelpuffer
6,06 g Trisbase
4 ml 10 % SDS
Ad 100 ml dest. Wasser
ph 6,8

Blocklösung/Blotto
TBS + 0,05 % Tween 20 + 5 % FCS

2.3 Geräte

Elektrophoresekammer	Biometra/ Göttingen, Deutschland
Facs- Gerät	Becton- Dickinson/ Heidelberg, Deutschland
Filmentwickler	Sterling, Diagnostic Imaging/ Greenville USA
Linearbeschleuniger	LINAC SL25, Phillips/ München, Deutschland
Mikroskop	Hund, Wetzlar/ Ludwigshafen, Deutschland
Photometer	Ultrospec Plus/ Berlin, Deutschland
Schüttler	Biometra/ Goettingen, Deutschland
Sterilbank	Hereaus Instrument/ Hanau, Deutschland
Stickstofftank	Sigma/ München, Deutschland
Tankblot	BioRad/ München, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf/ Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Haake/ Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Hettich/ Deutschland

2.4 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier	Whatman 3MM/ Cambridge, UK
Kopierfolie	Xerox/ Neuss, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Hybond ECL, Amersham/ Buckinghamshire, UK
Röntgenfilm	Hyperfilm Amersham, Buckinghamshire, UK

2.5 Antikörper und Liganden

Primärantikörper für den Westernblot nach Santa Cruz	
anti- Caspase- 8, mouse	freundlicherweise erhalten von der Arbeitsgruppe Schulze-Osthoff / Münster, Deutschland
anti- Caspase- 3, mouse	Biolabs/ Ipswich, UK
anti- Caspase- 9, mouse	Biolabs/ Ipswich, UK
anti- Caspase-10, mouse	Biolabs/ Ipswich, UK
anti- PARP, rabbit	Biolabs/ Ipswich, UK
anti- Bid, rat	Biolabs/ Ipswich UK
anti- FADD	Transductionlabs

Sekundärantikörper für den Westernblot	
anti- rabbit IgG- AP	SantaCruz Biotechnology/ Heidelberg, Deutschland
anti- mouse IgG- AP	SantaCruz Biotechnology/ Heidelberg, Deutschland
anti- rat IgG- AP	SantaCruz Biotechnology/ Heidelberg, Deutschland

Liganden	
TRAIL (rekomb. human mit FLAG- TAG)	Alexis/ Grünberg, Deutschland
Enhancer (monoklonaler Ak gg. FLAG-TAG)	Alexis/ Grünberg, Deutschland
CD95, APO- 01, CH- 11	Biomol/ Hamburg, Deutschland

2.6 Zelllinien

Humane T- Zellymphomlinien Jurkat und deren Klone	
Jurkat A3	Freundlicherweise erhalten von J.Blenis, Boston
Caspase- 8 negative Jurkat Zellen	Freundlicherweise erhalten von J.Blenis, Boston
BJAB- Vector / Burkittlymphom- Zelllinie	Freundlicherweise erhalten von der Arbeitsgruppe Schulze- Osthoff
BJAB- FADD- DN/ Burkittlymphom Zelllinie	Freundlicherweise erhalten von der Arbeitsgruppe Schulze- Osthoff

3. Methoden

3.1 Zellkulturen

Verwendet wurde die humane T- Lymphomzelllinie Jurkat und die Burkittlymphom-Zelllinie BJAB.

Die Erhaltungkultur wurde jeweils mit 0.5×10^6 Zellen in 30 ml Medium ausgesät und im Brutschrank unter sterilen Bedingungen bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Kulturmedium diente RPMI, dem 10% FCS und 1% Antibiotikallösung (100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin) zugesetzt wurde.

Der Medienwechsel erfolgte in zweitägigem Abstand.

Die Lagerung über einen längeren Zeitraum erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C in 5 % DMSO/ 20% FCS und 75 % Medium.

3.1.1 Stimulierung mit TRAIL

TRAIL (TNF- related apoptosis inducing ligand) wurde den Zellen unter sterilen Bedingungen zugesetzt. 15 min vor der TRAIL- Applikation erfolgte der Zusatz monoklonaler Antikörper (FLAG-TAG/ Enhancer) in einer Konzentration von 1 µg/ml.

Die Stimulierung der Zellen wurde zu Teil in Kombination mit Bestrahlung durchgeführt.

3.2 Nachweis der Caspasenaktivität

3.2.1 Herstellung der Zellysate

50 µl Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblaulösung verdünnt. Die Anzahl der Zellen wurde in der Fuchs-Rosenthalkammer bestimmt (Anzahl der Zellen in 16 Felder × 5000 ergibt die Zellzahl in einem Milliliter).

Ein Zellysate bestand aus 2×10^6 Zellen bestehen und wurde in 150-200 µl Lysepuffer (s.o.) aufgenommen; es folgte die Inkubation auf Eis für 30 Minuten, daraufhin die Zentrifugation bei 6° C und 12000 U/min. Der Überstand wurde für die Versuche verwendet werden.

3.2.2 Proteinbestimmung

Vor Beladung der Trägergele für die Westernblotanalyse wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten bestimmt. Dies erfolgte anhand des Proteinassays nach Biorad. Das Konzentrat wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und zu 1 ml Lösung kamen 3µl Lysat; der sich so gebildete Farbstoff wurde mittels Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 595nm photometrisch bestimmt. Dabei entsprach die Extinktionszunahme der Gesamtproteinmenge. Im Anschluss wurden die Proben auf gleiche Mengen Protein normalisiert.

3.2.3 Aufnahme der Proteine in Probenpuffer

Den Lysaten erfolgte die Zusetzung von 7 µl Probenpuffer (zur sichtbaren Darstellung der Probe) und 1µl β-Mercaptoethanol, dessen reduzierende Eigenschaften zur Spaltung der Disulfidbrücken genutzt wurde, um den Zerfall der Proteinkomplexe in ihre Einzelbestandteile zu ermöglichen.

3.2.4 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Um die isolierten Proteine aufzutrennen wurden 12 und 14%-iges Polyacrylamidgele hergestellt (s.u.). Das Trenngel wurde in eine Vertikalkammer gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 45 min wurde das Wasser entfernt und ein Sammelgel auf ein Trenngel gegossen. Nach einer zweistündigen Polymerisationszeit konnten die Proben (3.2.2) aufgetragen werden. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem SDS- PAGE- Laufpuffer der Firma Roth bei 50mA (Sammelgel) bzw. 150mA (Trenngel). Als Größenstandard diente ein Rainbowmarker von Amersham (Buckinghamshire UK).

Tabelle 4: Die Gelzusammensetzung

Komponente	Sammelgel	Trenngel	
		12 %ig	14%ig
Trennpuffer	/	3,75 ml	3,75 ml
Sammelpuffer	1,25 ml	/	/
Wasser	3,00 ml	5,25 ml	4,25 ml
Gel 30	0,75 ml	6,00 ml	7,00 ml
APS 10%	50 µl	75 µl	75 µl
Temed	5 µl	7,5 µl	7,5 µl
20 % SDS	/	75 µl	75 µl

3.2.5 Westernblot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembran (ECL- Hybond, Amersham, Buckinghamshire UK) geblottet. Nach dem Transfer konnte das Bandenmuster durch 1 minütige Inkubation mit Ponceau- S- Lösung sichtbar gemacht werden, anschließendes Waschen mit destilliertem Wasser spülte den Farbstoff wieder aus. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in 5% FCS/0,05% und Tween20/TBS, ph 8,0 bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper benetzt. Die nicht-spezifisch gebundenen Antikörper wurden durch Waschen mit TBS- Triton entfernt (3×5 min). Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 30 Minuten bei RT mit dem sekundären Antikörper (Anti- Maus gekoppelt mit Alkalische Phosphatase 1:200000 (Santa Cruz). Die Membran wurde erneut für ca. 30 Minuten mit TBS- Triton gewaschen. Als letzter Schritt erfolgte der Zusatz einer TBS, ph 9,5 1:100 verdünnten CSPD Lösung. Die Detektion der Proteinbande erfolgte daraufhin in einer Röntgenfilmkassette durch Exposition mit einem Hyperfilm.

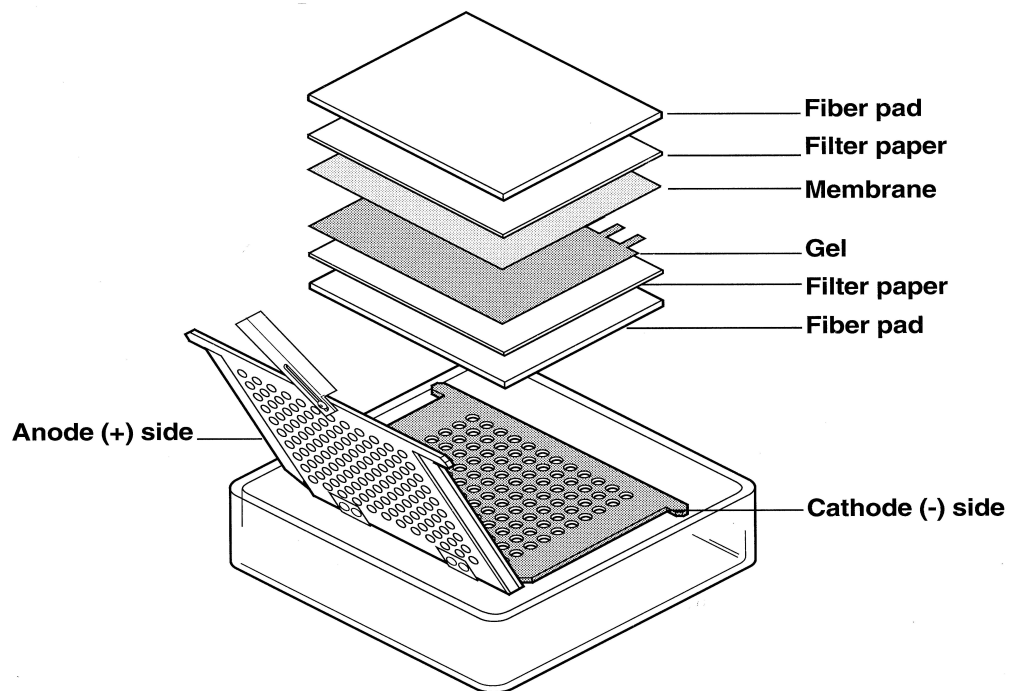


Abbildung 7: Blotaufbau als Tankblot

3.2.6 FACS-Analyse (Fluorescent activated cell scan)

3.2.6.1 Apoptosebestimmung nach Morphologie

Angewendet wurde die Durchflußzytometrie zur Analyse von Einzelzellen hinsichtlich Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zelle sind abhängig von der Zellkonstitution, der Granularität, der relativen Zellgröße, der Chromatinkondensation und der DNA-Degradierung.

Bei der Apoptosemessung erfolgte im FACS- Gerät anhand von 2 Laserstrahlen (dem Forwardscatter FSC und dem Sideward Scatter SSC).

Der FSC informiert über Zellgröße und -struktur, der SSC über optische Homogenität, intrazelluläre Granularität, Zytoplasma- und Kernkondensation.

Apoptotische und lebendige Zellpopulationen wurden in Darstellung im Koordinatensystem sichtbar, in welchem der SSC (Y-Achse) und FSC (X-Achse) in

logarithmischer Darstellung aufgetragen werden.

Jeder Punkt im Koordinatensystem entspricht einer Zelle. Frühe Apoptoseformen erkennt man am erniedrigtem FSC (Zellschrumpfung) und erhöhtem SSC (Zellkernkondensation, DNA- Fragmentierung und Chromatinkondensation), späte Apoptoseformen stellten sich durch eine niedrige Intensität des FSC und SSC-Signals dar; die Zelle wird nekrotisch.

3.2.6.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Noch bevor es beim Apoptosemechanismus zur Zellschrumpfung kommt, erfolgt eine Depolarisation und ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials: $\Delta\Psi_m$. Zur Fluoreszenzanalyse von $\Delta\Psi_m$ eignen sich lipophile und membrangängige Fluoreszenzfarbstoffe, wie Rhodamin 123 (RH 123) und TMRE (Tetramethylrhodaminethomidat) ; der Farbstoff wird von lebenden Zellen in den Mitochondrien akkumuliert ; oben genanntes TMRE lagert sich also an die mitochondriale Membran und ändert bei Laserstrahlanregung , je nach Depolarisation der Membran, die Intensität des Fluoreszenzsignals; die Intensität des Fluoreszenzsignals kann im Fluoreszenzkanal 2 (FL-2) des Durchflußzytometers abgelesen werden.

Die Datenauswertung erfolgt hier jedoch in Histogrammen, deren horizontale Achse die Fluoreszenz, und vertikale Achse die Anzahl der Ereignisse pro Klasse angibt.

3.2.6.3 Die Hoechst-Färbung

Eine anschauliche Möglichkeit der Apoptosedarstellung ist die Hoechstfärbung bei der 10^6 Zellen benötigt wurden; im pelletierten Zustand erfolgte diesen der Zusatz von 1ml RPMI-Medium und $1\mu\text{g/ml}$ Hoechstfarbstoff 33342. Die statistische Auswertung wurde nach viertelstündiger Inkubation im Fluoreszenzmikroskop bei einem Filter von 350nm durchgeführt, wobei apoptotische Zellen durch hell leuchtende segmentierte Kerne und nekrotische Zellen durch hell leuchtende unsegmentierte Nuclei auffielen.

Die Auswertung aller Versuche erfolgte durch Mittelung der Messwerte \pm SD von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

4. Ergebnisse

4.1 Apoptosemessung bei TRAIL-Behandlung und bei Bestrahlung in Jurkat- und BJAB-Zellen

Ionisierende Strahlung und TRAIL bewirken eine Apoptoseinduktion.

Es wurden Lymphomzellen der Reihe BJAB in den folgenden Versuchen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TRAIL (25 ng und 100 ng) stimuliert. Nachfolgende Abbildung veranschaulicht die in folgenden Versuchen gewonnenen Daten. Ein Punkt entspricht einer Zelle. Die apoptotischen Zellen werden markiert und es kann ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellpopulation errechnet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Spontanapoptose von der spezifischen Apoptose abzuziehen ist.

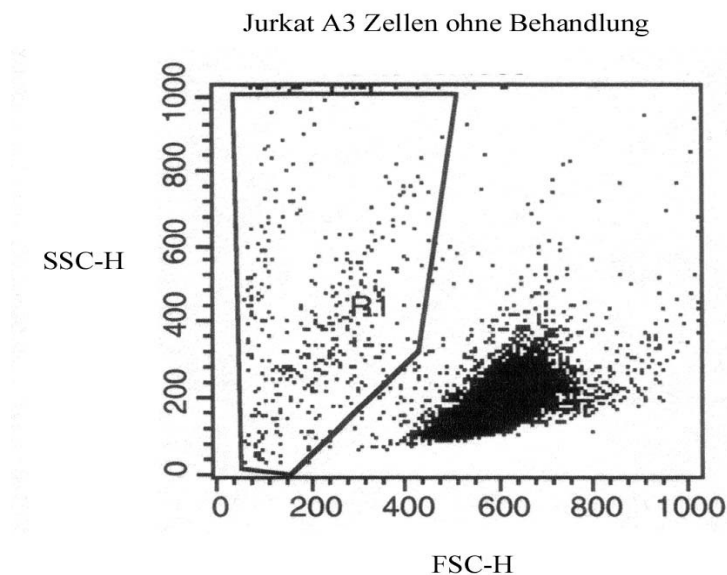


Abbildung 8(a): Unbehandelte Jurkat Zellen, die Fläche R1 entspricht der Spontanapoptose

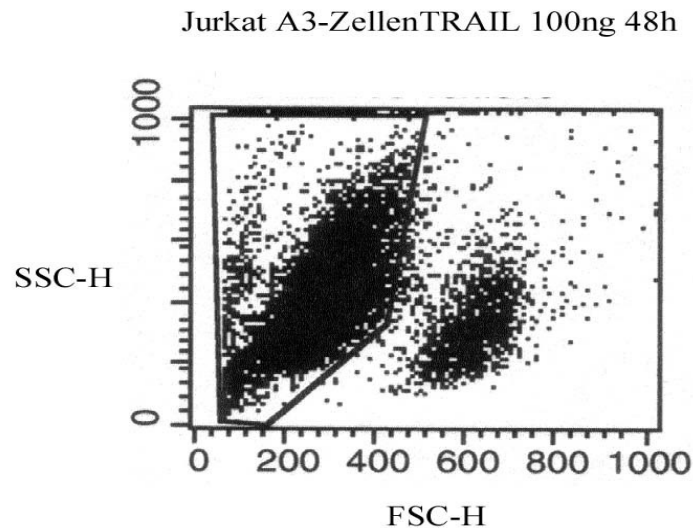


Abbildung 8(b): Jurkat-Zellen mit 100 ng TRAIL behandelt und nach 48 h gemessen. Die markierte Fläche entspricht der Apoptoserate nach 48 Stunden.

Um die Ergebnisse der Durchflußzytometrie durch ein zusätzliches Messverfahren zu verifizieren, wurde die Hoechst Kernfärbung angewendet. Der Kernfarbstoff ermöglichte die Differenzierung von apoptotischen (hell-leuchtend-segmentierten) und nekrotischen (matt-leuchtenden und nicht segmentierten) Zellkernen. Es konnten in beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Daher wurde in folgenden Versuchen nur die weniger zeitaufwendige Methode der Durchflußzytometrie angewandt.

4.1.1 Zeit und Dosisabhängigkeit von TRAIL

TRAIL ist zeit- und dosisabhängig. Abbildung 8 soll dies demonstrieren. Die Applikation von TRAIL erfolgte immer mit einem Zusatz von 1 µg/ ml Enhancer (Antikörper, der TRAIL- Moleküle oligomerisiert und so auch zur Oligomerisierung der Rezeptoren und damit zur Verstärkung der TRAIL- Signaltransduktion führt).

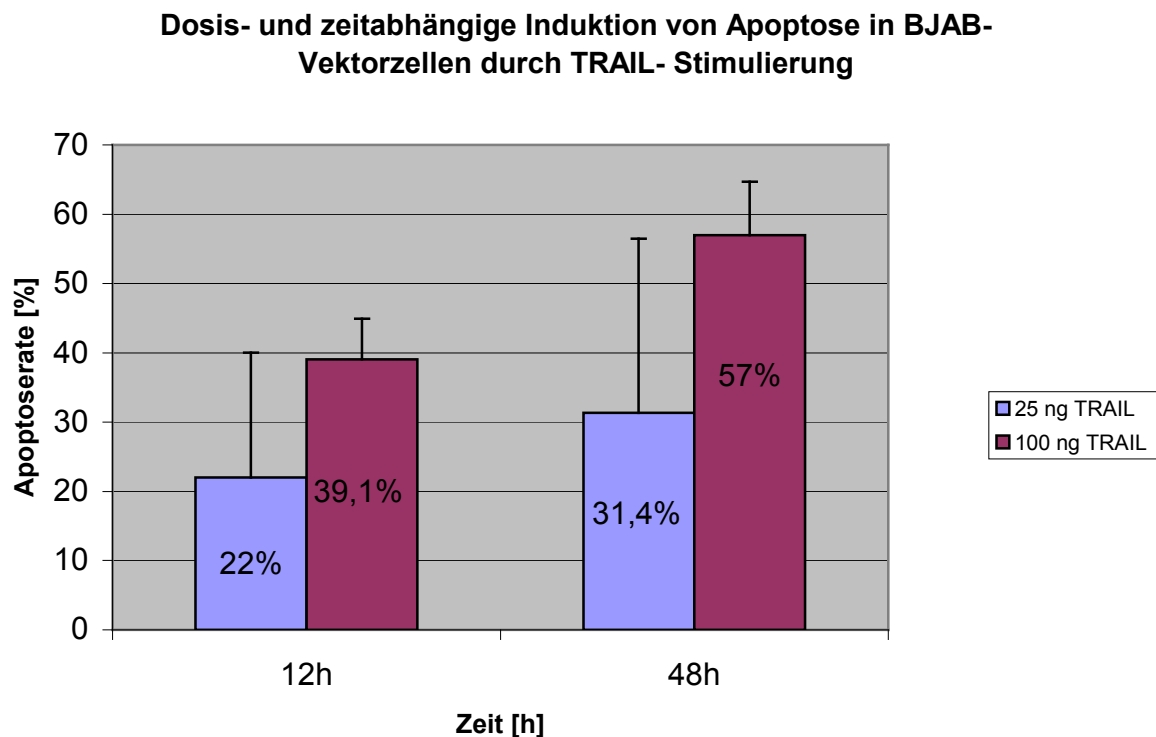


Abbildung 9: Zeit- und dosisabhängige Apoptose in BJAB- Lymphomzellen. Die Balken stellen die Standardabweichung dar.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Apoptoseinduktion durch Bestrahlung. In folgendem Diagramm ist die Apoptoserate nach Bestrahlung von BJAB- Zellen mit 5 und 10 Gray ersichtlich.

Dosis- und zeitabhängige Induktion von Apoptose durch ionisierende Strahlung in BJAB-Zellen

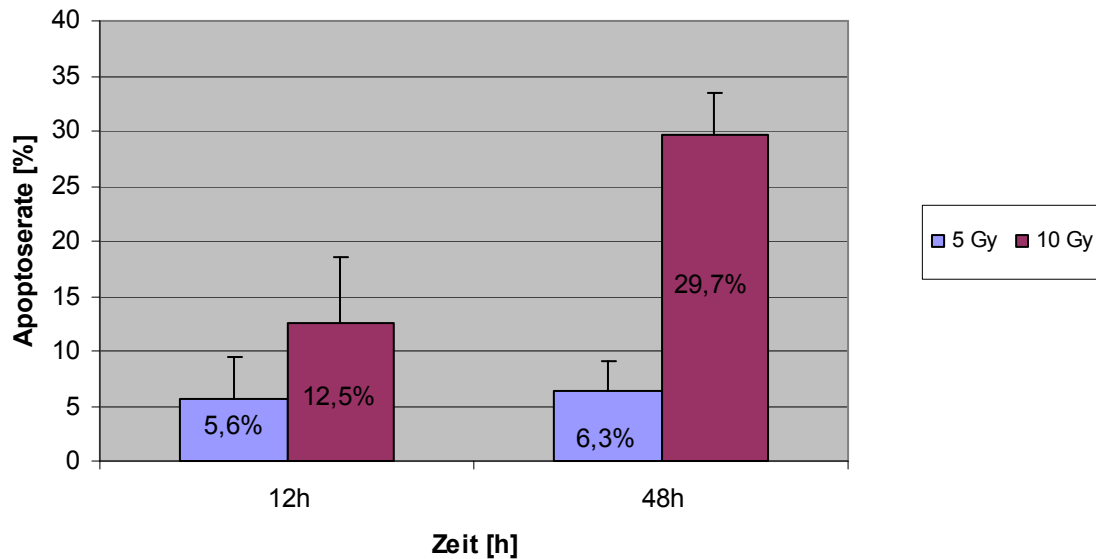


Abbildung 10: Dosis- und zeitabhängige Apoptose durch ionisierende Strahlung in BJAB- Zellen. Die Balken stellen die Standardabweichung dar.

4.2 Die Rolle von FADD

Das FADD Molekül steht im zelltodvermittelten Rezeptorweg als Adapterprotein zwischen Rezeptor und Caspasen an oberster Stelle. Forschungsergebnisse zeigten, dass das FADD Molekül im TRAIL- Rezeptorweg möglicherweise keine essentielle Rolle spielt (67). Daher soll nun in folgenden Versuchen die Rolle des FADD- Moleküls in der TRAIL- induzierten Apoptose verifiziert werden.

Dazu wurden zwei Lymphomzelllinien verwendet. Einerseits die BJAB-Lymphomzellen, welche das FADD- Molekül exprimieren. Andererseits die BJAB-FADD-DN Lymphomzellen (FADD dominant negative Mutante). Diese Zellreihe zeichnete sich durch ein trunkiertes FADD- DN Molekül aus; durch Überexpression dieser defekten FADD- Form besteht also eine blockierte FADD- Funktion. Die Expression des trunkierten FADD- DN Moleküls konnte mittels Western-Blott

verifiziert werden.

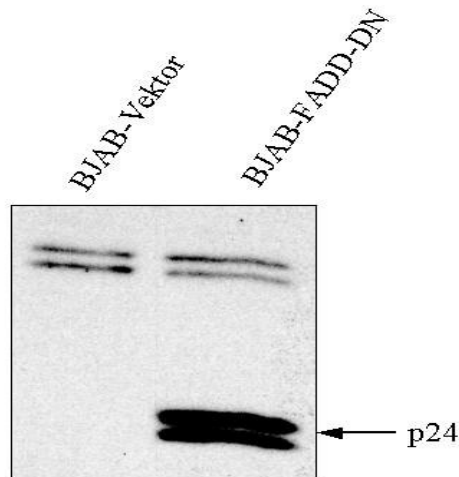


Abbildung 11: Nachweis des FADD- DN- Moleküls. Das trunkierte FADD- DN Molekül kann nur in der in der BJAB- FADD- DN- Zellkultur nachgewiesen werden. Die obere Doppelbande, bei beiden Zelllinien sichtbar, weist das untrunkierte FADD- Molekül nach.

4.2.1 Einfluss der Überexpression von FADD- DN auf die TRAIL-induzierte Apoptose

In folgendem Experiment sollte untersucht werden, welche Wirkung TRAIL auf BJAB und BJAB- FADD- DN- Zellen ausübt. Beide Zellreihen wurden mit 25 und 100 ng TRAIL/ml stimuliert.

Die Apoptoserate wurde für beide Zellreihen jeweils nach 12, 24, 36, 48 Stunden mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal durchgeführt und die Apoptoserate statistisch ausgewertet.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass TRAIL- Stimulation bei der BJAB- FADD- DN-Zellpopulation keine Apoptose hervorrief, im Gegensatz zu einer Apoptoserate von 70 % bei der BJAB - Vektorzelllinie.

BJAB-Vektor und FADD-DN nach TRAIL-Stimulierung (25ng/ml und 100 ng/ml)

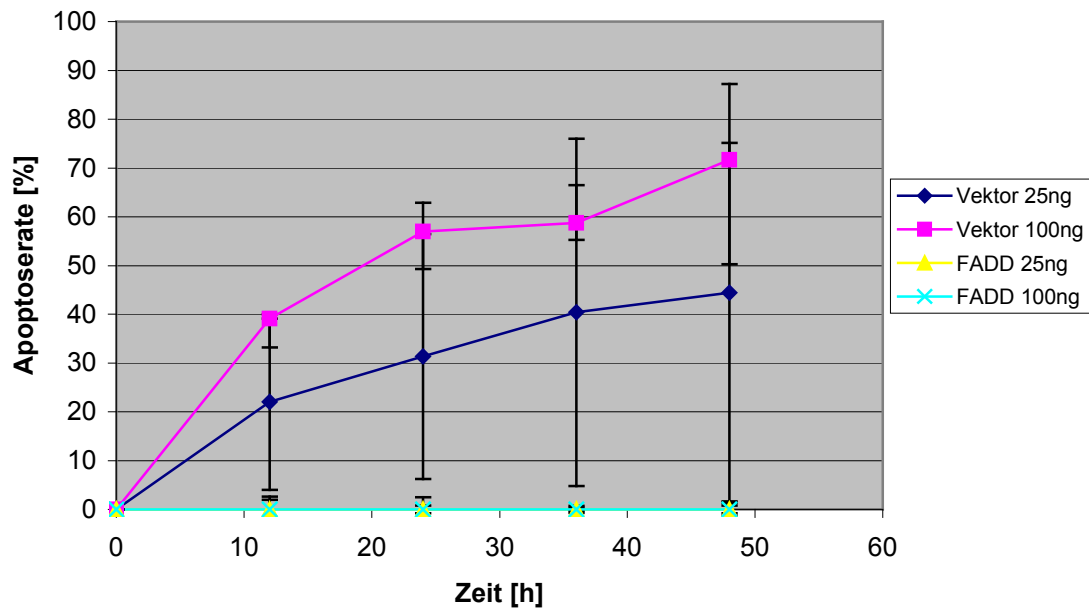


Abbildung 12: Nachweis von Apoptose nach TRAIL- Stimulierung mit 25 und 100 ng/ml in BJAB- Vektor und BJAB- FADD-DN-Zellen; die Ergebnisse wurden mittels Durchflußzytometrie gewonnen; die Überexpression von FADD-DN hemmt die TRAIL-induzierte Apoptose. Die Balken stellen die Standardabweichung dar (n=3).

Die TRAIL- Apoptose scheint somit bei BJAB- FADD- DN- Zellen vollständig gehemmt.

4.2.2 Einfluss der Überexpression von FADD- DN auf strahleninduzierte Apoptose

Zur Beantwortung der Fragestellung der FADD- Abhängigkeit der strahleninduzierten Apoptose wurden im Folgenden BJAB- Lymphomzellen (Kontroll- Vektor- Zellen) und BJAB- FADD- DN untersucht. Die beiden Zelllinien wurden mit jeweils 5 und 10 Gray bestrahlt. Der strahleninduzierte Apoptoseweg

läuft hauptsächlich über das Mitochondrium (siehe Kapitel 1.2.1.3) und nutzt die Caspasenaktivierung als Verstärkungsmechanismus.

Abbildung 13 zeigt: für beide Zelllinien gilt, je höher die Strahlenwirkung, umso größer die prozentuale Apoptoserate. Die BJAB- Vektor und BJAB- FADD- DN- Zellen zeigten bei 10 Gy nach 48h eine Apoptoserate von 30% und 17%. Bei 5 Gy ist kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate nachweisbar: FADD- DN: 4% Apoptoserate und BJAB- Vektor: 6 % Apoptoserate.

BJAB-Vektor und FADD-DN Zellen nach Bestrahlung mit 5 und 10 Gy

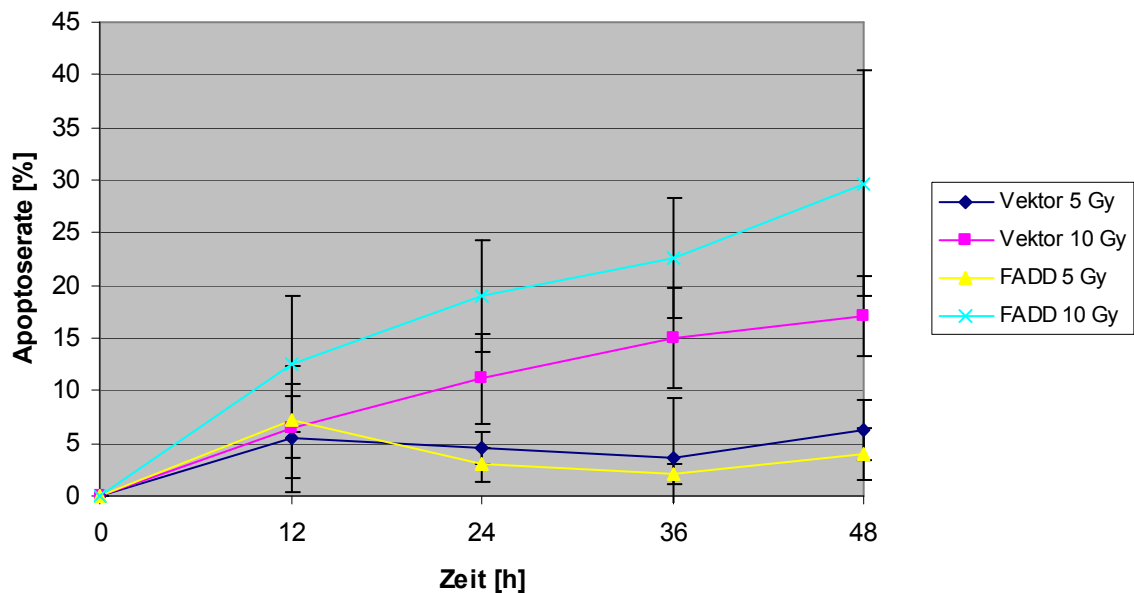


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Induktion von Apoptose durch Bestrahlung mit 5 und 10 Gy in Vektor und FADD- DN- Zellen; in Zellen mit Überexprimierung von FADD-DN ist Apoptose im Gegensatz zu TRAIL- Apoptose nachweisbar. Die Balken stellen die Standardabweichung dar (n=3).

4.2.3 Kombinationswirkung von Bestrahlung und TRAIL-Stimulation

FADD ist für den TRAIL-induzierten Apoptosemechanismus essentiell. Dagegen reagieren BJAB-Vektor und BJAB-FADD-DN-Zellen auf Bestrahlung ohne signifikanten Unterschied. Um die Frage der FADD-Abhängigkeit der Kombinationsbehandlung zu klären, wurden nun BJAB-Vektor und BJAB-FADD-DN-Zellen mit der Kombination aus beiden Apoptosestimuli behandelt.

Beide Zelllinien wurden mit einer TRAIL-Dosis von 100 ng/ml vorbehandelt und 10 Stunden später mit 10 Gy bestrahlt.

Abbildung 14 zeigt folgende Ergebnisse: Die Vektorzellen zeigten unter Behandlung mit 10 Gy eine Apoptoserate von 17,1 %, die Behandlung mit 100 ng TRAIL erzielte eine Apoptoserate von 71,1 %. In der Kombinationsbehandlung war eine Apoptoserate von 84,9 % zu verzeichnen.

Das zweite Diagramm stellt die Apoptoseraten der BJAB-FADD-DN-Zellen unter Einzelbehandlung dar. Nach Stimulierung mit 10 Gray: 29,7 %, nach Behandlung mit 100 ng TRAIL: 0 %. In der Kombinationsbehandlung ließ sich eine Apoptoserate von 34,4 % erzielen.

Demzufolge scheint die Kombinationsbehandlung bei BJAB-FADD-DN-Zellen keine nennenswerte Erhöhung der Apoptoserate (34,4 %) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 10 Gy (29,7 %) zu bewirken.

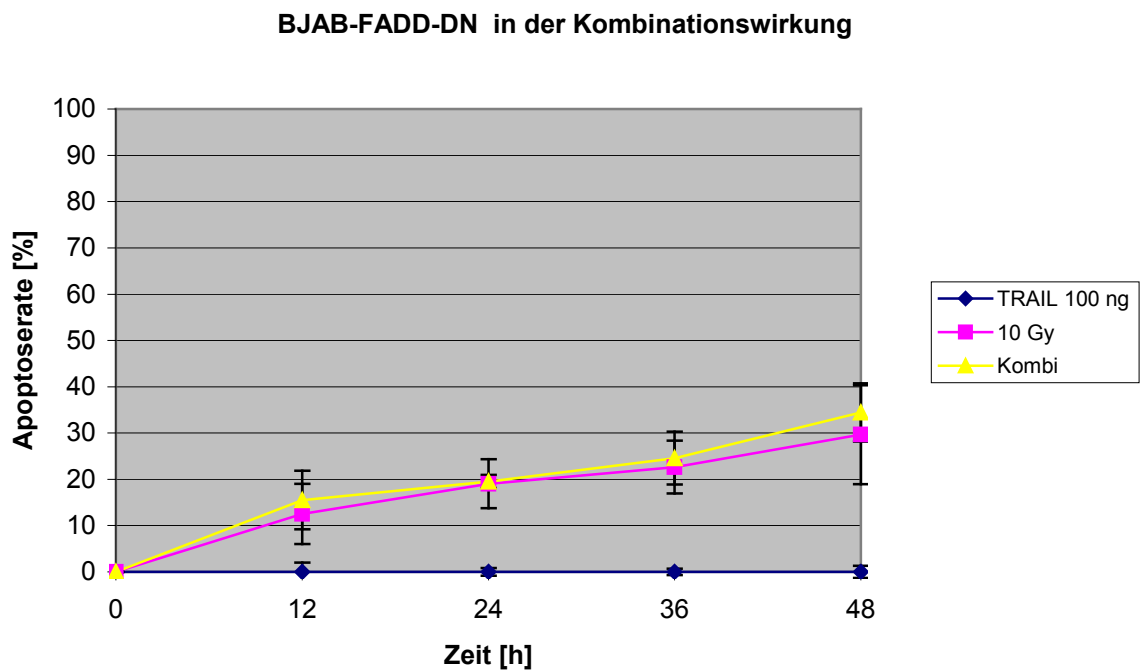
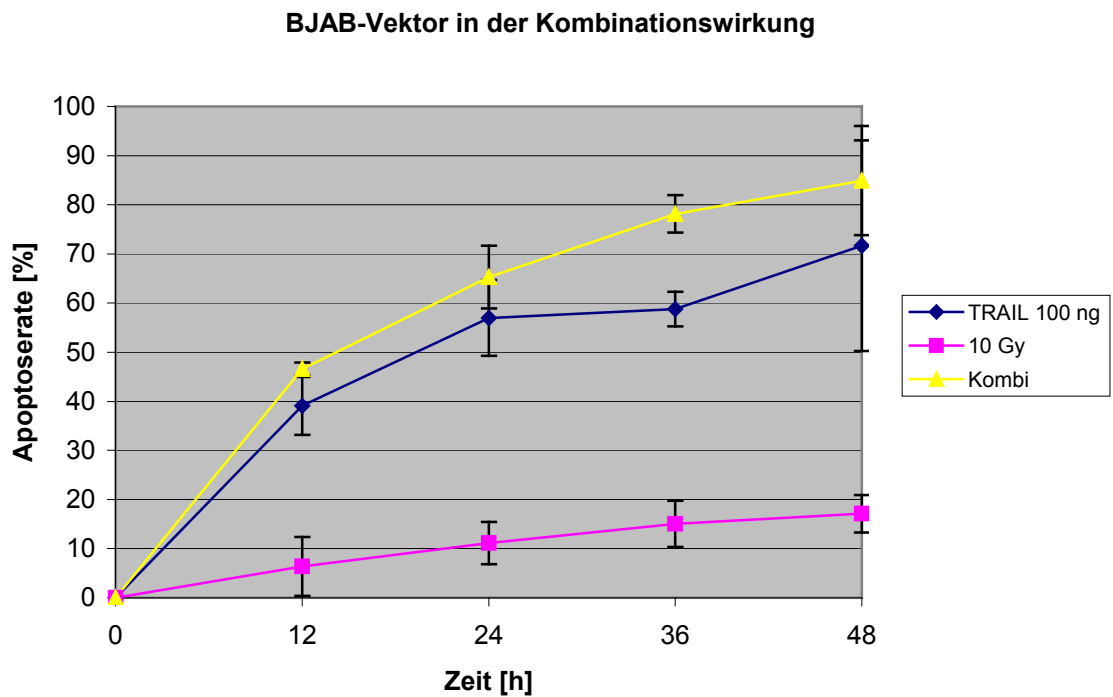


Abbildung 14: Kombinationsbehandlung von BJAB- Vektor und BJAB- FADD- DN- Zellen mit 10 Gy und 100 ng /ml TRAIL. Die Ergebnisse wurden mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Erkennbar ist eine durch Kombinationsbehandlung erzielbare Apoptoserate von 84,9 % bei BJAB- Vektor- Zellen; im Vergleich dazu die Einzelbehandlung mit TRAIL: 71,1% und Einzelbehandlung mit ionisierender Strahlung: 17,1%.

4.2.4 Caspasenaktivierung durch TRAIL- Behandlung, ionisierende Strahlung und Kombinationsbehandlung

Parallel zu obigen Versuchen sollte nun die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung, TRAIL oder Kombinationsbehandlung, wie in Kapitel 4.2.1 bis 4.2.3 gezeigt wurde, biochemisch mittels Westernblottechnik erfasst werden.

Dazu wurden BJAB- Vektor und BJAB- FADD-DN Zellen mit 10 Gy bestrahlt. Nach 12 Stunden erfolgte die Herstellung der Zellsate. In einer zweiten Versuchsreihe wurden beide Zelllinien mit 100 ng /ml TRAIL stimuliert und in einer dritten Versuchsreihe wurden beide Zelllinien in einer Kombination aus 100 ng/ml TRAIL und 10 Gy behandelt. In Abbildung 15 erkennt man die ungespaltene Procaspasenform (Procaspase- 8) und die durch Caspasenspaltung entstandene aktive Form: hier p 43/41 Caspase-8. Die Caspasenaktivität lässt sich je nach Filmbelichtung durch Zunahme der Spaltprodukte (hier PARP-cleaved p85) oder Abnahme der Procaspasenform (Procaspase 8 p55/54) nachweisen.

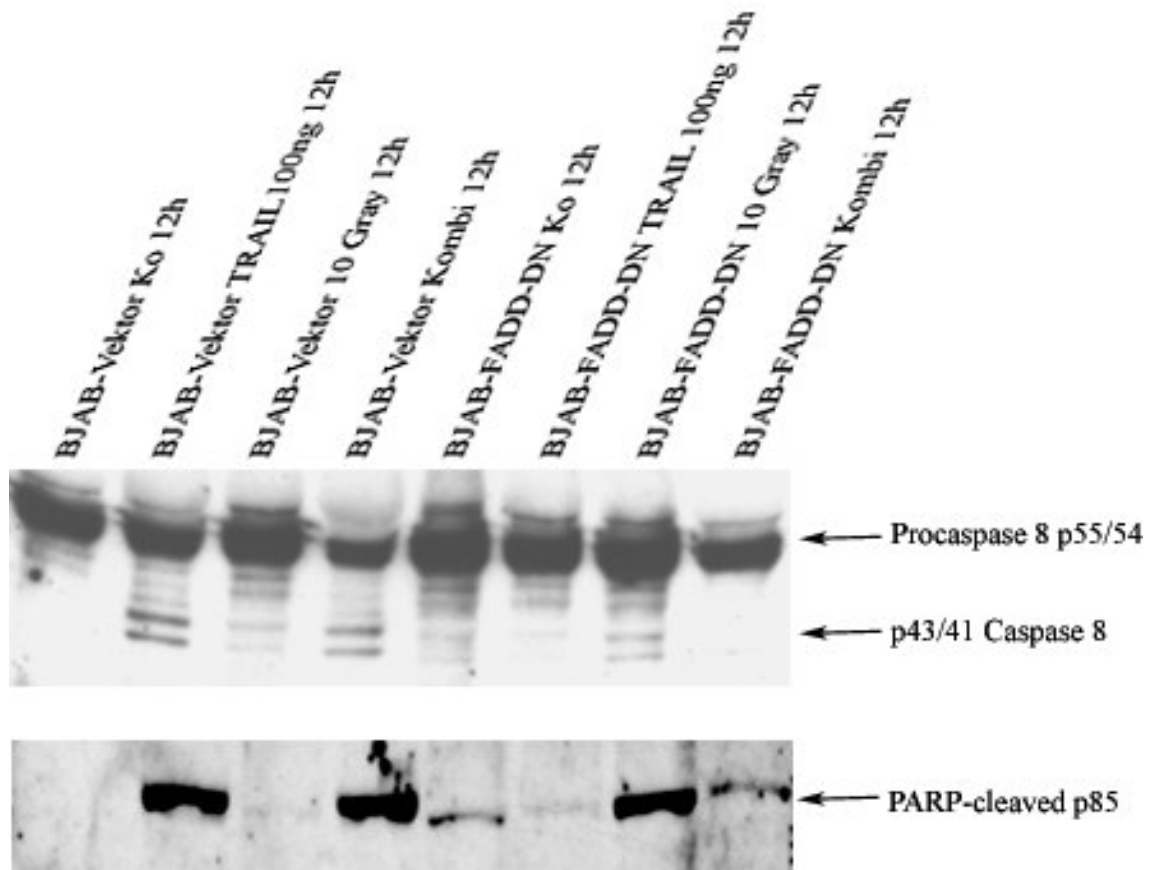


Abbildung 15: Aktivierung von Caspase- 8 und dem Caspase- 8 Spaltprodukt (PARP-cleaved) in der Einzelbehandlung mit TRAIL und 10 Gray Bestrahlung, sowie in der Kombinationsbehandlung in BJAB- Vektor und BJAB- FADD- DN- Zellen. Die Abkürzung Ko steht für die unbehandelten Zellen. Die Zunahme der Caspasenaktivierung bei Kombinationsbehandlung in der BJAB- Vektorzellreihe ist an der Abnahme der inaktiven Proform von Caspase- 8 ersichtlich. Caspase 8 wird nach Kombinationsbehandlung in BJAB- Vektorzellen stärker gespalten, als in FADD- DN Zellen. Die Einzelbehandlung von FADD- DN Zellen mit TRAIL führt zu keiner signifikanten Caspase- 8- Spaltung.

4.3 Weitere molekulare Mechanismen bei der Kombination des TRAIL-Zelltodliganden mit ionisierender Strahlung

Die Kombination von TRAIL mit ionisierender Strahlung führt zu deutlich erhöhten Effekten bei der Apoptose in malignen Zellsystemen. In den vorangegangenen Versuchen wurde demonstriert, dass FADD essentiell für die Kombinationswirkung ist und der Kombinationseffekt nur in Zellsystemen zu beobachten ist, welche das FADD-Molekül exprimieren.

4.3.1 Nachweis von Caspase- 8

Zur Überprüfung der Rolle von Caspase- 8 in der zelltodrezeptorvermittelten, strahlungsinduzierten und kombinierten Apoptose wurden zwei Zelllinien untersucht : die Kontrollzelllinie : Jurkat A3 (diese Zelllinie ist Caspase- 8 positiv) und die Caspase-8 negative Zelllinie, ohne Caspase- 8.

Abbildung 16 zeigt im Westernblotverfahren, dass in Caspase-8 negativen Zellen Procaspase-8 nicht nachweisbar ist.

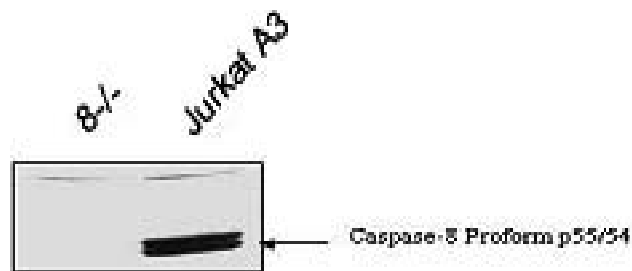


Abbildung 16 : Nachweis von Procaspase 8. In der Kontrollzelllinie: Jurkat A3 ist die Procaspase 8 vorhanden, in Caspase- 8 negativen Zellen lässt sich die Procaspase 8 nicht nachweisen.

4.3.2 Rolle von Caspase-8 für die TRAIL- induzierte Apoptose, die strahleninduzierte Apoptose und die Kombinationsbehandlung

In der Literatur (siehe Kapitel 1.2.1.6) gibt es mehrere Hinweise, dass Apoptose, ausgelöst durch Zelltodrezeptoren, wie beispielsweise Fas, TRAMP/DR-3 und TNF α abhängig von Caspase-8 sind. Demnach erwiesen sich Zellen mit erhöhtem FLIP- (flice inhibiting protein) Spiegel resistent gegenüber dem TRAIL- Stimulus (94, 95).

Ziel nachfolgender Experimente ist die Caspase- 8 Abhängigkeit für die TRAIL- Behandlung und Bestrahlung zu untersuchen. Folgende Versuche zeigen die Apoptoseraten nach Einzelstimulus (Abbildung 17) und Kombinationsbehandlung (Abbildung 18). Wie in vorigen Versuche erfolgte die Auswertung der Apoptoseraten mittels FACS- Analyse.

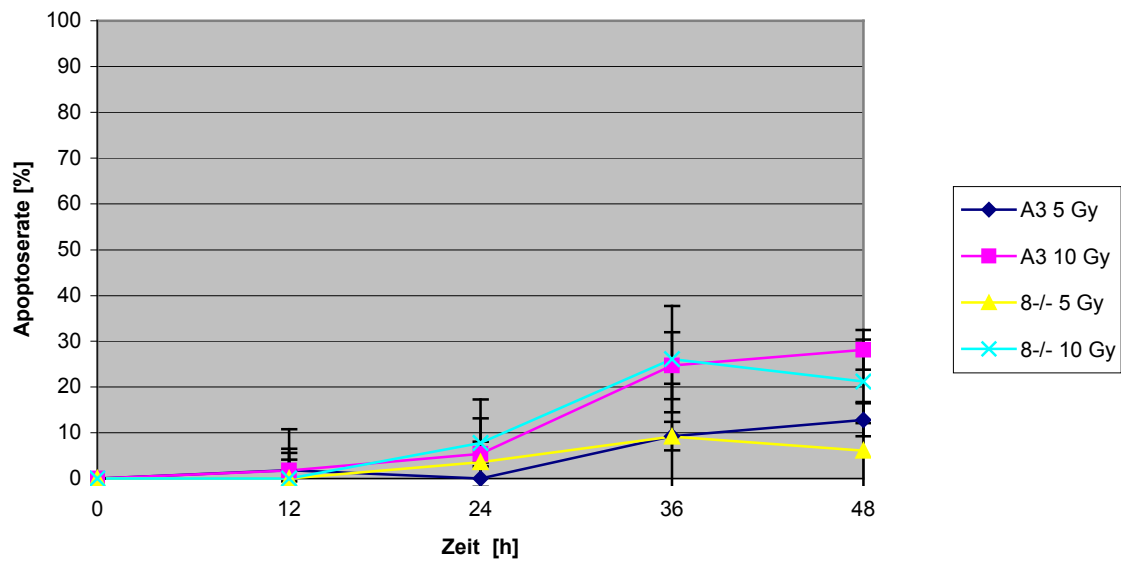
Aus Abbildung 16 ist ersichtlich: Caspase- 8- negative und Jurkat A3- Zellen zeigen unter Bestrahlung mit 5 und 10 Gray vergleichsweise ähnliche Apoptoseraten.

Unter TRAIL- Einzelstimulus (100 ng) lassen sich in der Jurkat- Zellpopulation Apoptoseraten von 97,01 % erzielen, in der Caspase- 8- negativen Zellreihe: 30 %.

Die Kombination aus beiden Stimuli zeigt in Jurkat A3- Zellen keine nennenswerte Steigerung der Apoptoserate. Unter TRAIL- Einzelstimulus zeigt sich eine Apoptoserate von 83,5 % unter Kombinationsbehandlung: 84,4 %. Demnach berechnet sich ein Zuwachs der Apoptoserate in der Kombinationsbehandlung um 0,9 %.

Die Caspase 8- negative Zelllinie hingegen reagiert bei Kombination der beiden Einzelstimuli (10 Gy Einzelbehandlung: 21,19 % Apoptoserate, 100 ng TRAIL Einzelbehandlung: 21,09 % Apoptoserate) mit einem supraadditiven Effekt. Denn in der Kombinationsbehandlung ist eine Apoptoserate von 57,09 % zu verzeichnen.

Wirkung von Bestrahlung auf Jurkat A3 und Caspase-8-negative Zellen



Trail- Einzelstimulus

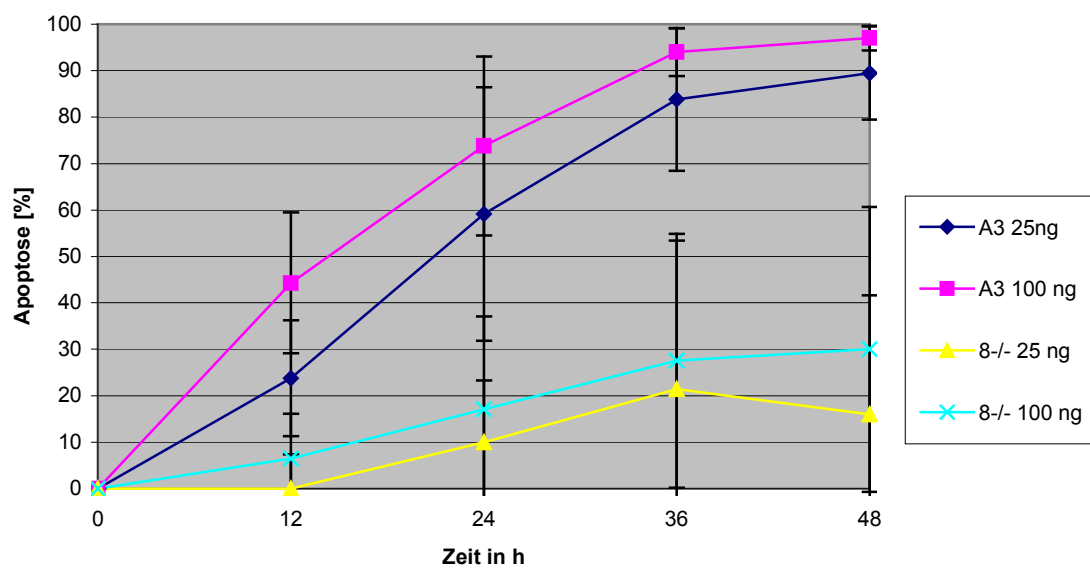


Abbildung 17: Apoptoseinduktion nach TRAIL- Stimulus (oben) und Bestrahlung (unten) in Caspase-8-negativen-Zellen(hier abgekürzt als 8-/-) und in deren Jurkat A3-Kontrollzellen. TRAIL führt in 8-/- Zellen zu einer reduzierten Apoptose. Im Vergleich dazu reagieren Jurkat und 8-/- Zellen auf Bestrahlung etwa gleich. Die Spontanapoptose wurde berücksichtigt, die Balken entsprechen der Standardabweichung.

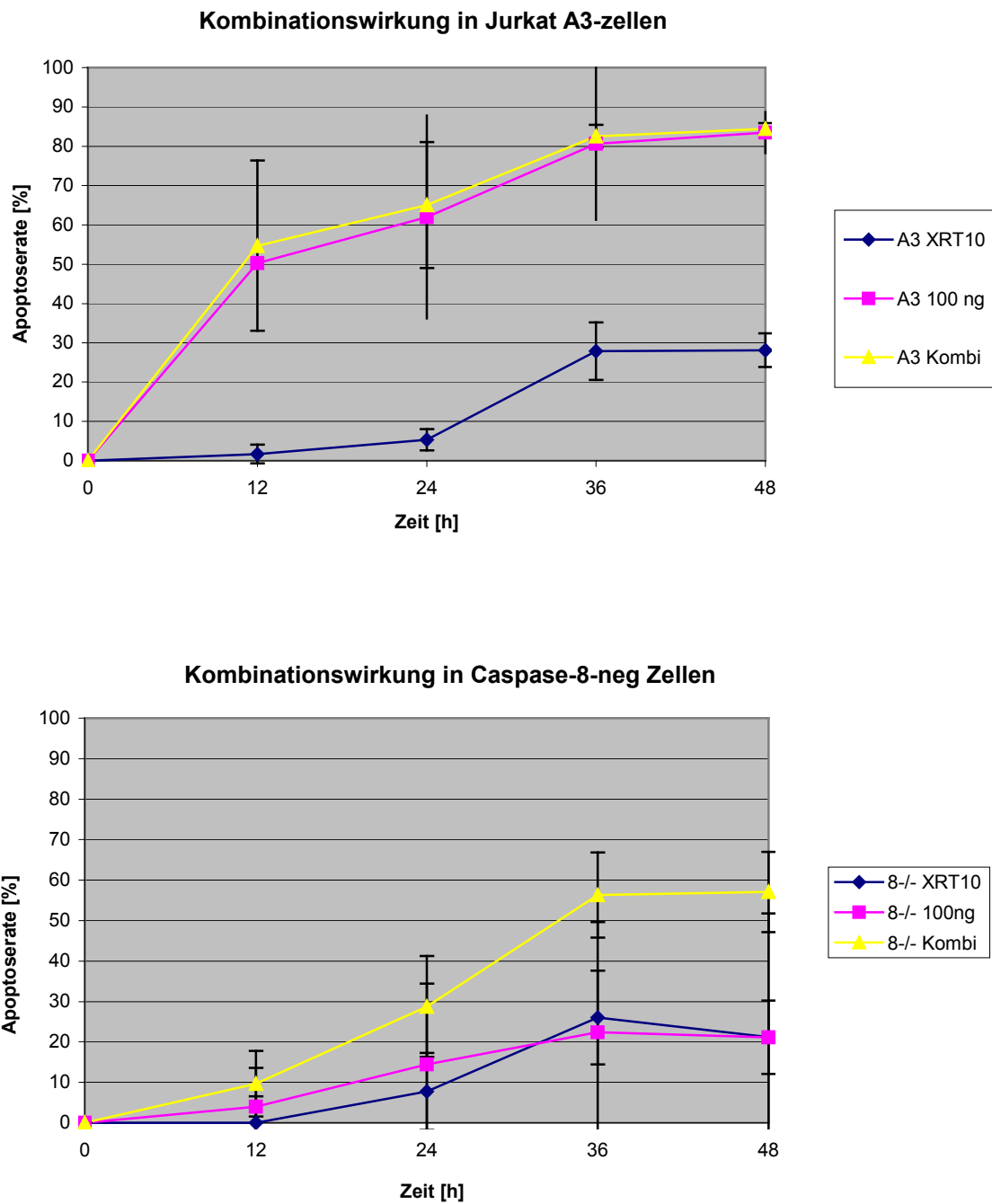


Abbildung 18: Apoptoseinduktion nach Kombinationsbehandlung in Jurkat A3- Zellen (oben) und Caspase 8-/- Zellen (unten). In beiden Zellpopulationen lässt sich eine Kombinationswirkung nachweisen. Die Caspase 8-negative Zelllinie reagiert bei Kombination der beiden Stimuli mit einem supraadditiven Effekt.

Der TRAIL- Rezeptorweg impliziert die Rekrutierung von FADD als Adaptermolekül an den Rezeptor. Es folgt daraufhin die autoproteolytische Aktivierung von Caspase-8 und danach Caspase-3. Der simple Kaskadenweg wird durch die Anwesenheit einer mitochondrialen Verstärkungskaskade kompliziert, welche die Caspase-8 vermittelte Aktivierung des Bid- Moleküls beinhaltet. PARP fungiert als Spaltsubstrat von Caspase-8. Daher wurde parallel zu den oben einsehbaren Ergebnissen der Durchflusszytometriemessung in der Caspase-8 negativen und Jurkat A3 Zelllinie die Aktivität von Caspase-3, Bid und PARP durch Westernblot für die Einzelstimuli und Kombinationsbehandlung biochemisch ermittelt. Alle Lysate wurden nach jeweils 20 Stunden hergestellt.

Abbildung 19 zeigt, dass 20 Stunden nach Stimulation von Jurkat A3 Zellen mit 100 ng/ml TRAIL ein Teil der Procaspase 3 und fast der komplette Teil der PARP-Proform aufgebraucht wurde. Dagegen sind die inaktiven Formen nach Kombinationsbehandlung der Jurkat- A3 Zellen deutlich reduziert, zugunsten ihrer Spaltprodukte. Bei den Caspase- 8 negativen Zellen zeigen sich in der Einzelbehandlung kaum Spaltprodukte im Sinne von aktivierter Caspase- 3 und dem PARP- Spaltprodukt p85. Erstaunlich hingegen ist das deutlich nachweisbare PARP Spaltprodukt in der Kombinationsbehandlung, wobei PARP- Proform noch fast unverbraucht zur Darstellung kommt.

Caspase- 8 spielt demnach keine Rolle für die Kombinationsbehandlung.

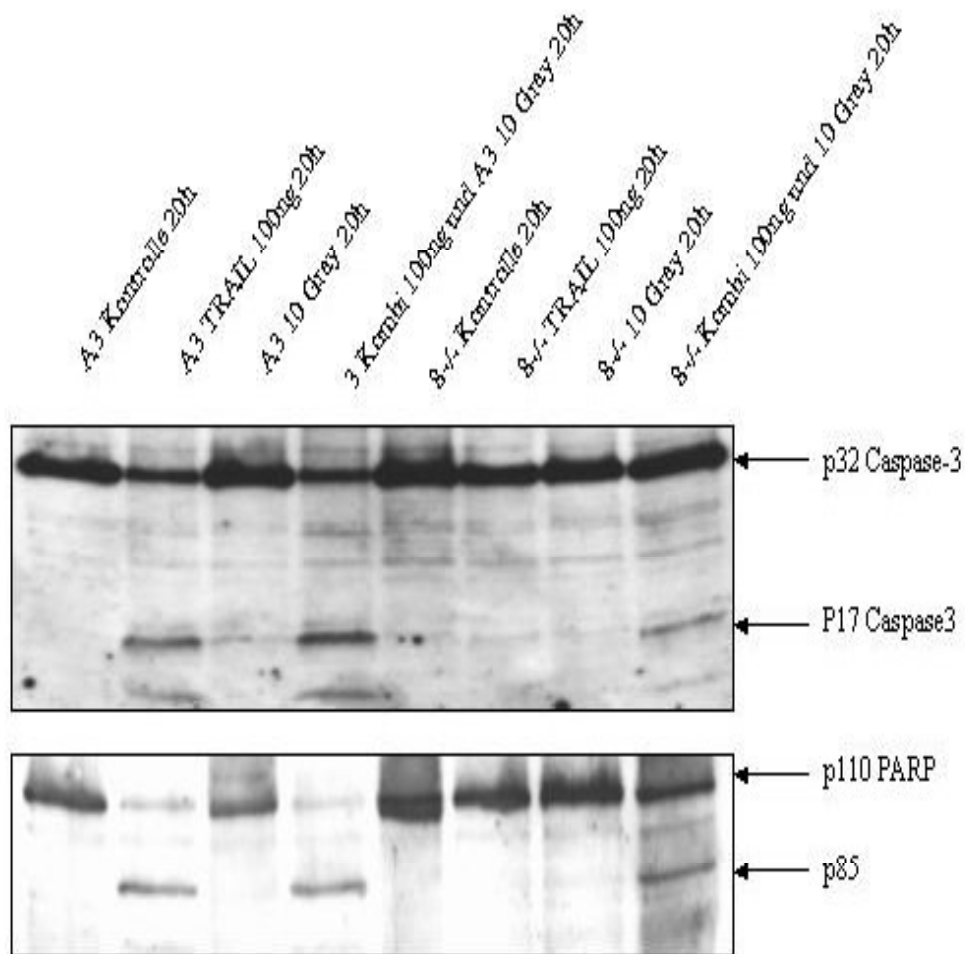


Abbildung 19: Westernblotergebnisse der Einzelbehandlung (10 Gray Bestrahlung und Stimulierung mit 100 ng/mlTRAIL) und Kombinationsbehandlung Caspase- 8- negativer und Jurkat-A3-Zelle; Zunahme der Caspasenaktivierung bei der Kombinationsbehandlung ist bei den Jurkat A3 Zellen an der Abnahme der inaktiven Proformen von Caspase- 3 und PARP zu erkennen.

Aus Abbildung 17 unteres Diagramm geht eine Apoptoserate von ~20 Prozent nach TRAIL Stimulierung Caspase- 8 negativer Zellen hervor. Daher war auch hier die Untersuchung auf Aktivität von Caspase- 3, Bid, und PARP nach Einzelstimulierung mit TRAIL interessant. Abbildung 19 zeigt 48 Stunden nach TRAIL-Stimulierung bei Jurkat A 3 Zellen eine komplett aufgebrauchte Bid-Caspase-3 und PARP- Proform. Bei Caspase 8-/- Zellen kommt es 48 h nach Stimulus erst zur Darstellung der Spaltprodukte von Bid, Procaspase 3 und PARP.

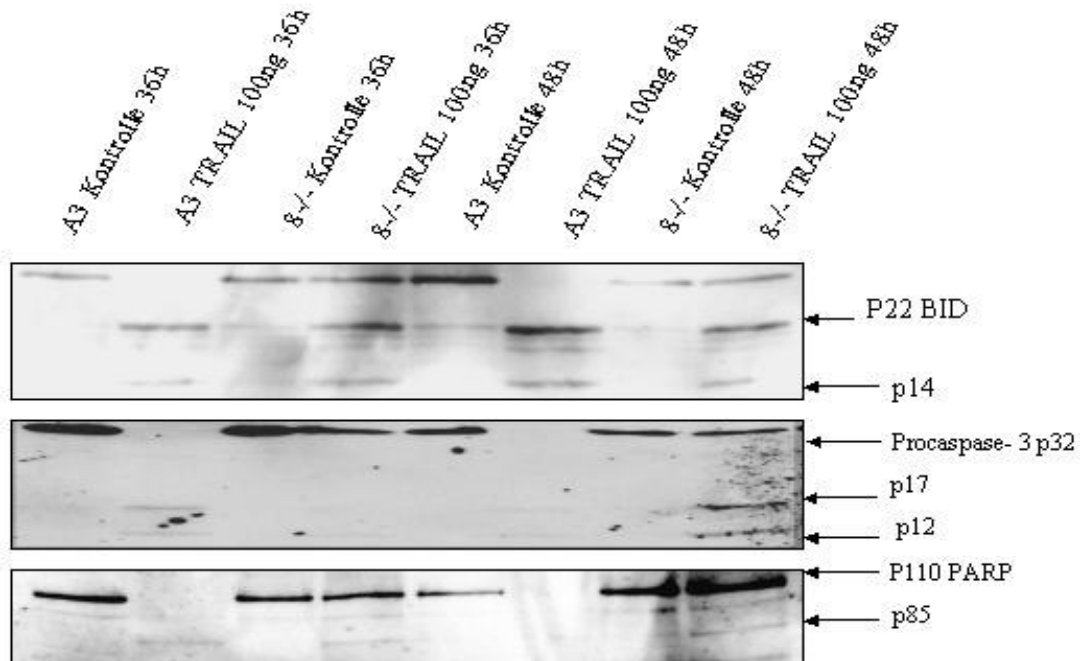


Abbildung 20: Apoptoseinduktion in Jurkat A3 und Caspase 8^{-/-} Zellen nach Einzelstimulus mit TRAIL (100ng/ml) Zunahme der Caspasenaktivierung ist in Jurkat A3 Zellen nach alleiniger TRAIL-Behandlung nach 48h an der Abnahme ihrer inaktiven Proform von Bid, Caspase-3 und PARP deutlich erkennbar. Nach 48 Stunden findet man in Caspase 8 negativen Zellen nach Einzelstimulus mit TRAIL erstmals die Spaltprodukte von Bid (p14), Caspase-3 (p-17 und p12) und PARP (p85).

4.3.3 Einfluß anderer Caspasen in der Kombinationswirkung

Eine Kombination von TRAIL und Bestrahlung ist an das Vorhandensein von FADD geknüpft. Da in dem durchgeführten Kombinationsexperiment mit Caspase-8 defizienten Zellen trotzdem ein synergistischer Effekt nachweisbar war, sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob es eine alternative Initiatorcaspase gibt, die als Surrogat für Caspase-8 dienen könnte. Daher wurde die Aktivierung von Caspase-10 untersucht. Abbildung 21 zeigt, dass TRAIL in Abwesenheit von Caspase-8 zur Aktivierung von Caspase-10 führen kann.

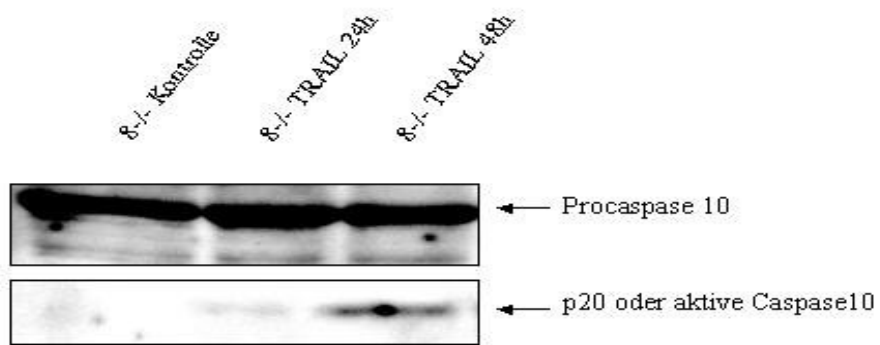


Abbildung 21: Caspase-10- Aktivierung nach Stimulierung Caspase-8 defizienter Zellen mit TRAIL- Einzelstimulierung Nach 48h ist in Caspase-8-negativen Zellen die Spaltung von Caspase-10 erkennbar.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Induktion von Apoptose in Tumorzellen ist ein wichtiges Ziel in der radioonkologischen und medikamentösen Tumorbehandlung.

Die Kombination zweier Apoptosemechanismen (Zelltodrezeptorstimulation und ionisierende Strahlung) kann zu deutlich höheren Apoptoseraten führen. Da unklar ist, welche Moleküle für den Kombinationseffekt verantwortlich sind, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit die Frage untersucht, ob FADD und bestimmte Caspasen (Caspase- 8 und 10) für den Kombinationseffekt verantwortlich sind.

Vorliegende Ergebnisse demonstrieren, dass die Caspasenaktivierung über Zelltodrezeptoren FADD- abhängig verlaufen kann. TRAIL- Stimulus führt in BJAB Zellen zur Caspase-8-Aktivierung. Zellen mit trunkiertem FADD Molekül zeigen im Westernblot keine Caspasenaktivierung.

Verwendet man im Einzelstimulus ionisierende Strahlung, so ist kein Unterschied in der Caspasenaktivierung von BJAB und BJAB- FADD- DN Zellen ersichtlich. Strahlentherapie kann FADD- unabhängig Apoptose induzieren.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nur in Zellen mit intaktem FADD Molekül ein additiver Apoptoseeffekt nach Kombination von TRAIL und Bestrahlung erzielt werden kann (Abbildung 14). Es lässt sich demnach schließen, dass das FADD- Molekül essentiell für den Kombinationseffekt ist.

Tumorzelllinien entziehen sich der Apoptoseinduktion durch Resistenzmechanismen. So wurden von TEITZ et al. Neuroblastomzelllinien untersucht, die sich durch Caspase- 8- Negativität auszeichneten (104). Die weiteren Versuche in vorliegender Doktorarbeit demonstrieren die Rolle von Caspase- 8 in der Einzelbehandlung und in der Kombination (TRAIL und ionisierende Strahlung).

TRAIL- Einzelstimulierung führt in Caspase- 8 negativen Zellen nach 48 h zu einer niedrigeren Apoptoserate (30%) als in Jurkat- Zellen (97%). Ionisierende Strahlung führt in Jurkat und Caspase- 8 negativen Zellen zu einer

vergleichbaren Apoptoserate. Unter Kombinationsbehandlung (100 ng TRAIL und 10 Gy) zeigte sich in Caspase- 8 besitzenden Zellen kein additiver Apoptoseeffekt. In Caspase- 8 negativen Zellen hingegen wies die Kombinationsbehandlung einen synergistischen Apoptoseeffekt auf (Abbildung 18).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse: FADD ist essentiell für den Kombinationseffekt und der Kombinationseffekt von TRAIL und Bestrahlung ist nur partiell von Caspase 8 abhängig. Abbildung 21 demonstriert die Aktivierung der Caspase 10 in Caspase- 8 negativen Zellen, als möglichen Erklärungsversuch für den synergistischen Apoptoseeffekt nach Kombinationsbehandlung in Caspase- 8 negativen Zellen.

5.2 Weitere Signaltransduktionsmechanismen von TRAIL

Außer der Caspasenaktivierung führt TRAIL- Stimulierung (ähnlich der TNF- Stimulierung) zur FADD und Caspasen- unabhängigen Aktivierung vom Transkriptionsfaktor NF- κ B (105). Die Aktivierung von NF κ B führt zur Aktivierung von Proteinkinasen, welche das Stress-Signal von der Zelloberfläche in den Zellkern weiterleiten. Es folgt die Transkription antiapoptotischer Gene (106, 107). Unklar erscheint die genaue Beeinflussung der Apoptosemechanismen durch NF κ B. So demonstrierte JEREMIAS et al. dass die Hemmung der NF κ B- Aktivierung in Lymphomzellen zur Wiederherstellung der TRAIL- Sensibilität führte (108).

Ebenfalls kann TRAIL zur Stimulation der so genannten stressaktivierten Proteinkinasen (JNK und SAPK) führen (109). MÜHLENBECK untersuchte die JNK- Stimulierung in HeLa Zellen die in diesen caspasenabhängig erfolgte. In einem weiteren Zellsystem, den Kym-1 Zellen konnte eine caspasenunabhängige JNK- Aktivierung gezeigt werden. Untersuchungen der Forschergruppe bestätigten eine FADD- unabhängige Aktivierung des JNK- Systems. Unklar bleibt, inwiefern die Aktivierung des JNK- Systems zur Apoptose beiträgt. Scheinbar wirkt die JNK- Aktivierung unterstützend auf die TRAIL- induzierte Apoptose. Die alleinige JNK- Aktivierung reicht jedoch nicht

zur Apoptoseinduktion aus.

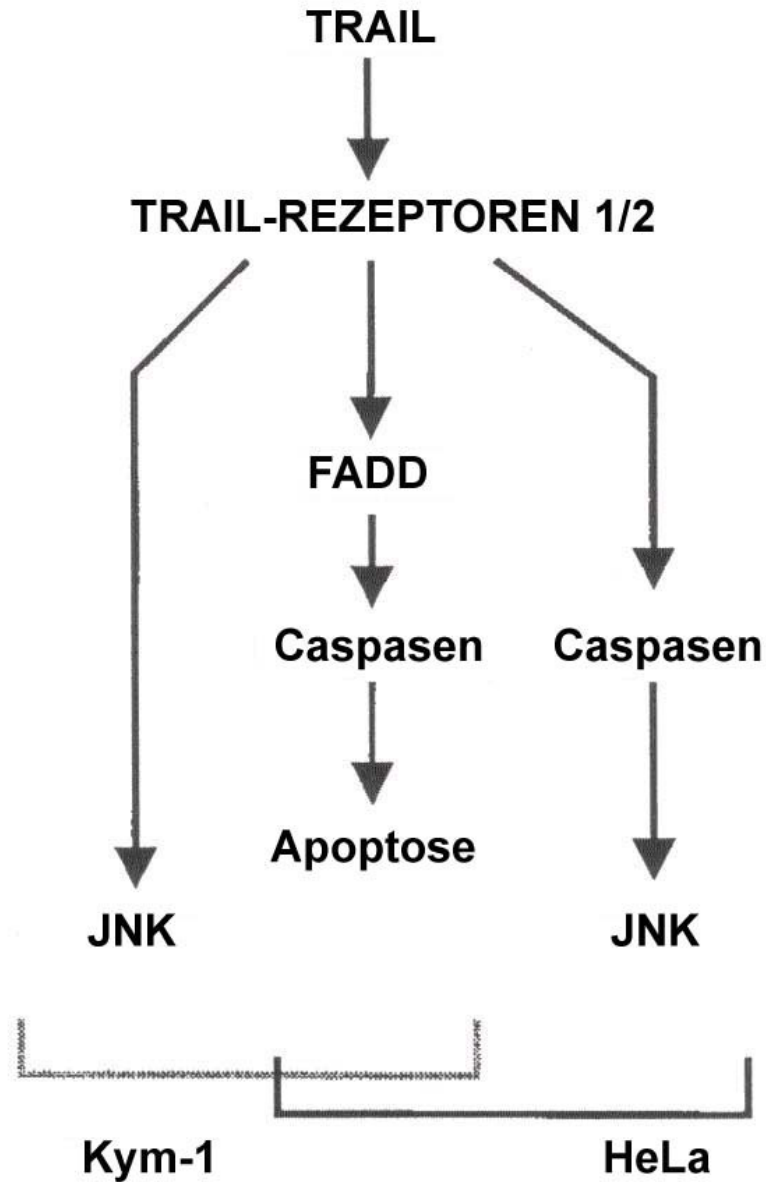


Abbildung 22: Schematische Darstellung der JNK- Aktivierung durch TRAIL. Nach MÜHLENBECK et al. 1998 (109). In KYM- 1 Zellen erfolgt die JNK- Aktivierung caspasenunabhängig. In HeLa-Zellen ist diese caspasenabhängig. Die alleinige JNK- Aktivierung resultiert nicht in der Apoptose der Zelle.

5.3 FADD- Abhängigkeit der TRAIL- Behandlung und der Kombinationsbehandlung

Die Signalkaskade über die Zelltodrezeptoren CD- 95, TRAIL- R1 und TRAIL- R2 weisen eine gewisse Strukturähnlichkeit auf. Die Bindung von CD- 95 Liganden bewirkt eine Trimerisierung des Rezeptors. Daraufhin folgt die Rekrutierung von FADD als Adaptermolekül, was zur autoproteolytischen Aktivierung von Caspase- 8 führt (71, 83). Noch ist unklar, welches Adaptermolekül der TRAIL- Rezeptor benötigt. SCHNEIDER et al. zeigte eine FADD- abhängige Signaltransduktion über den TRAIL- R1 und TRAIL- R2 Rezeptor. Ebenso demonstrierte diese Forschergruppe, dass Zellen mit dominant negativem FADD keine Apoptoseinduktion aufweisen (110).

PAN et al. berichten andererseits über einen FADD- unabhängigen Apoptosemechanismus über den TRAIL- Rezeptor- DR 4 (67).

Vorliegende Doktorarbeit demonstriert in FADD- exprimierenden Zellen nach TRAIL- Applikation im Westernblot eine Caspase- 8 Spaltung. In FADD- DN Zellen lässt sich im Westernblot keine Caspase- 8 Spaltung nachweisen. Es kann geschlussfolgert werden, dass die TRAIL- induzierte Apoptose FADD abhängig verläuft. Insgesamt kann die Wirkung auf den einzelnen Rezeptor DR4 und DR5 in diesem Setting nicht unterschieden werden.

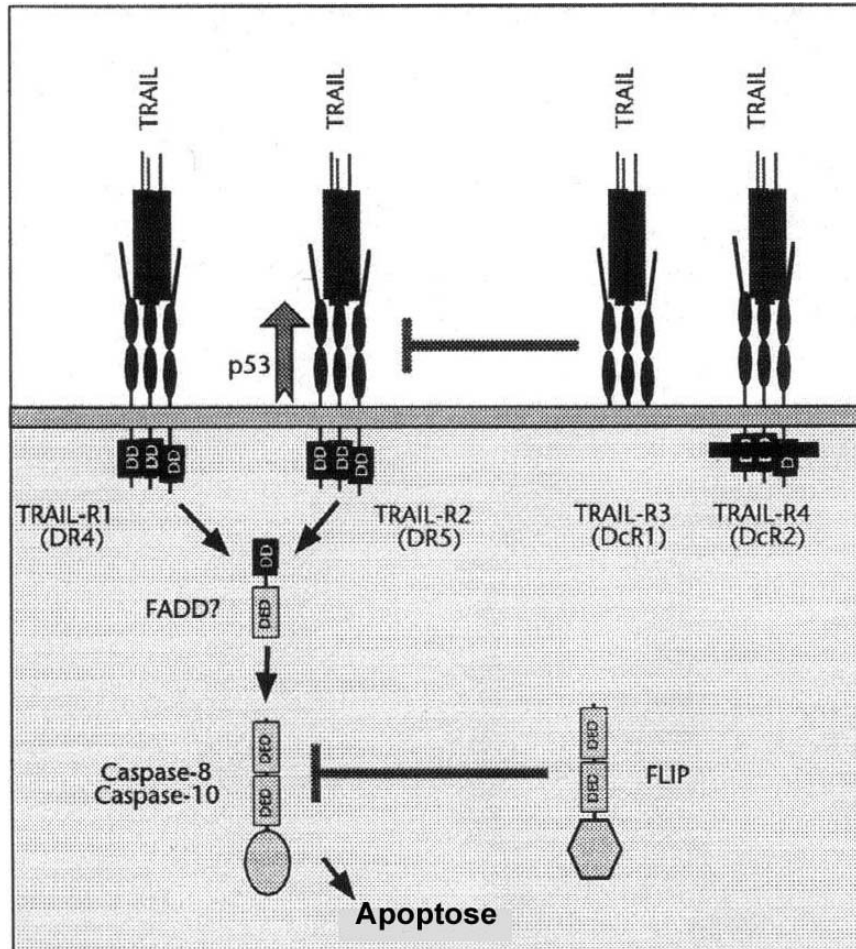


Abbildung 23: (nach L.E. French und J. Tschopp ,1999 (111)) Apoptosemechanismus des TRAIL-Rezeptors TRAIL-R1 und - R2. Beide Rezeptoren sind Typ 1-transmembranäre Proteine und besitzen die zytosolische Todesdomäne death domain zur Apoptoseinduktion. Im Gegensatz dazu besitzen weder TRAIL- R3 (welches GPI-gelinkt ist) noch TRAIL-R4 (mit trunkierter zytosolischer Todesdomäne/ death domain) die Möglichkeit der Apoptoseinduktion. Nach Ligandenbindung an den Rezeptor erfolgt die Rekrutierung des FADD- Adaptermoleküls an den Rezeptor, welcher die autoproteolytische Aktivierung von Caspase- 8 initiiert.

Ebenso ist aus vorliegender Arbeit ersichtlich, dass FADD für den Kombinationseffekt essentiell ist, denn nur in BJAB- Zellen konnte nach Kombinationsbehandlung ein additiver Apoptoseeffekt erzielt werden (siehe Abbildung 14).

5.4 Caspase- 8 Abhängigkeit der TRAIL- Behandlung und der Kombinationsbehandlung

Der Caspase- 8 Aktivierung wird die wichtigste Rolle in der Apoptoseinduktion durch TRAIL zugeschrieben. BODMER et al. zeigte, dass Caspase- 8 negative Zellen keinen DISC- Komplex formen konnten und gegenüber TRAIL- Konzentrationen von 1 µg/ml 16 h lang apoptoseresistent blieben (112). Die Forschungsergebnisse der Gruppe KISCHKEL et al. und WANG et al. zeigen eine Aktivierung von Caspase- 10 nach TRAIL- Stimulus (113, 114). WANG et al. zeigte: Zellen mit Caspase- 10 Mutation reagieren resistent auf Einzelbehandlung. Auch die Daten der Forschergruppe PAN et al. legt die Annahme nahe, dass Caspase- 10 neben Caspase- 8 ebenfalls eine Rolle in der TRAIL- vermittelten Apoptose spielt: Apoptose über die Rezeptoren DR4 und DR5 ließ sich durch die dominant negative Form von FLICE (= Caspase 8) nur partiell blockieren (67).

Abbildung 21 zeigt in Caspase- 8 negativen Zellen 48h nach TRAIL Behandlung die Aktivierung von Caspase- 10. Im Gegensatz zu BODMER et al. (112) wurde hier eine Beteiligung von Caspase- 10 in der TRAIL- vermittelten Apoptose gezeigt. Die Tatsache, dass ähnliche Versuchsanordnungen zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen führten, kann auf die unterschiedlichen Messzeitpunkte der Apoptoserate zurückgeführt werden. So erfolgte in vorliegender Arbeit eine Messung der Apoptoserate zu einem erheblich späteren Messzeitpunkt (48h). Eine Restaktivität von Caspase- 8 in Caspase- 8 negativen Zellen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Für die Kombinationsbehandlung ist die Anwesenheit von Caspase- 8 nicht essentiell notwendig. In Abbildung 18 ist ersichtlich: In Caspase- 8 negativen Zellen ist nach Kombinationsbehandlung mit einem supraadditiven Apoptoseeffekt nachweisbar.

5.5 Erklärungsversuch für die Entstehung des Kombinationseffektes

Zusammenfassend kann gefolgert werden: FADD wird für den Kombinationseffekt benötigt. Der Kombinationseffekt ist caspasenunabhängig. Chinnayian et al. zeigte, dass Vorbestrahlung von Mammacarcinomzellen zu einer TRAIL- Sensibilisierung führte (115). Dieser Effekt wurde auf die Heraufregulierung von TRAIL- Rezeptoren: DR5 zurückgeführt (116). Auch Leukämiezellen zeigten nach Vorbestrahlung eine vermehrte Expression von TRAIL- R1 Rezeptoren (117). MARINI et al. untersuchte den Kombinationseffekt von ionisierender Strahlung und TRAIL in soliden Tumorzellgruppen. Alle reagierten in der kombinierten Behandlung mit verstärkten Apoptoseraten; der Kombinationseffekt war am deutlichsten in den Gruppen, in denen die sequentielle TRAIL- Applikation nach ionisierender Bestrahlung erfolgte. In fünf der sechs Zelllinien ließ sich eine Heraufregulation des TRAIL- Rezeptors DR5 dokumentieren. Die Heraufregulation des Rezeptors korrelierte jedoch nicht mit der TRAIL Sensibilität. Schlussfolgernd ist die Heraufregulierung des TRAIL- Rezeptors nicht der einzige Mechanismus, der für die TRAIL- Sensibilisierung verantwortlich gemacht werden kann (117). Abgesehen von der Heraufregulierung extrazellulärer Rezeptoren ermöglichen ebenfalls intrazelluläre Moleküle einen Kombinationseffekt. So zeigt BROADDUS et al., dass Bid ebenfalls am synergistischen Effekt von TRAIL- und DNA-destruierenden Stimulus beteiligt ist (118).

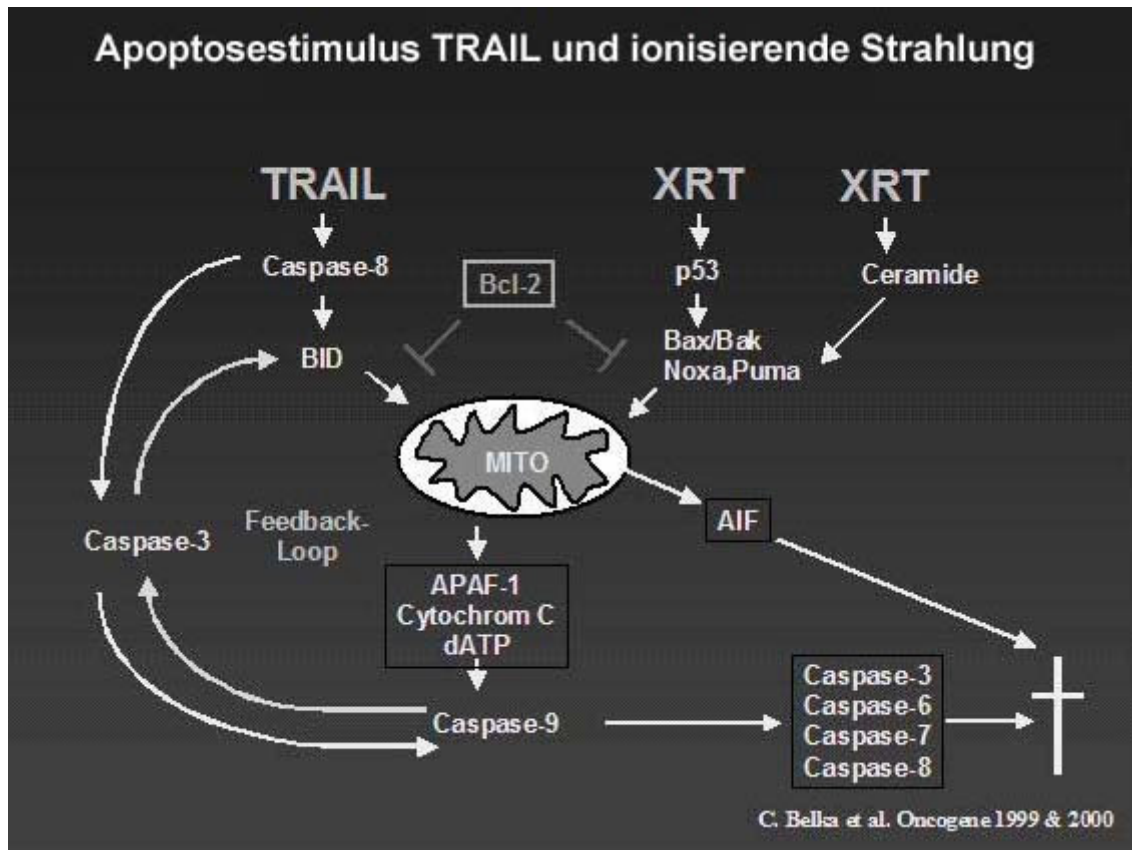


Abbildung 24: nach C. Belka (1999 & 2000)(119 und 120) Möglicher Wirkmechanismus der Kombinationstherapie von TRAIL und ionisierender Strahlung. TRAIL wirkt via FADD auf die Caspase-8 und Caspase-3 Spaltung. Caspase 3 und Caspase 8 bewirken via Bid die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom-c c. Die Cytochrom-c Freisetzung wird über Bcl-2 und Bcl-xl reguliert. Die mittels TRAIL aktivierte Caspase-3 vermag Bcl-2 zu spalten und dessen inhibitorische Funktion auf strahleninduzierte Apoptose aufzuheben. Ionisierende Strahlung kann über p 53 die proapoptotischen Bh3- Proteine Puma, Bax und Noxa aktivieren. Dies führt intrazellulär zur Freisetzung von AIF (apoptosis inducing factor) und zur Cytochrom c Freisetzung. Über Caspase 9 und Caspase 3 existiert ein Verstärkermechanismus via Bid. Ionisierende Strahlung ihrerseits verbessert die TRAIL-Wirkung durch Heraufregulation der TRAIL-Rezeptoren.

5.6 TRAIL- Effekt *in vivo*

TRAIL wurde nach der Erprobung im Zellmodell ebenfalls *in vivo* in athymischen Mäusen untersucht, welche Colonkarzinomzellen als Tumorenograft trugen. TRAIL- Injektion bewirkte eine Tumorregression oder Tumorsuppression. Mäuse mit soliden Tumoren zeigten nach TRAIL- Applikation Tumorzellapoptose, die mittels Westernblot dokumentiert werden konnte. Auch wirkte sich die TRAIL-Gabe günstig auf die Überlebenszeit aus (99).

TRAIL bietet im Gegensatz zum verwandten Zelltodliganden Fas- L einen Vorteil. Nach Applikation von Fas- L im Tiermodell traten neben der gewünschten Apoptosereaktion toxische Reaktionen (Leberversagen und septischer Schock) auf (96, 121, 122).

ASHKENAZI et al. und WALCZAK et al. konnten zeigen, dass keine TRAIL-toxische Wirkung auf Hepatozyten von Mäusen, Rhesus- Affen und Ratten zu erwarten ist (99, 100).

JO et al. beobachteten die TRAIL- Toxizität an humanen Hepatozyten (101). Allerdings widerlegten LAWRENCE et al. die Ergebnisse der Experimente von JO et al., indem die angebliche Toxizität des TRAIL- Moleküls auf dessen biochemische Aufbereitung zurückgeführt wurde (102). JO et al. arbeiteten mit einem aufbereiteten TRAIL- Molekül, welches mit einem Polyhistidinrest beladen war. LAWRENCE et al. änderten ihre TRAIL- Versionen in TRAIL.His und TRAIL.0 um. Die TRAIL.His Version induzierte, genau wie CD-95L in humanen Hepatozyten Apoptose, wohingegen das TRAIL.0- Molekül keinerlei apoptotischen Effekt in Hepatozyten hervorrief. Die intravenöse Applikation von TRAIL.0 am Tiermodell (Schimpanse und Maus) wurde ebenfalls ohne klinische Nebenwirkung (Leberschädigung) vertragen. Somit scheint der Anwendung von TRAIL in der Tumorthherapie weiterhin sehr viel versprechend.

6. Zusammenfassung

In der Statistik der Todesursachen stehen Krebserkrankungen in den Industrieländern an zweiter Stelle. Der Therapieerfolg der Strahlentherapie ist jedoch durch Normalgewebstoleranzen und Resistenzmechanismen (Bcl-2 und Caspase-8- Negativität) von Tumorzellen eingeschränkt. Deshalb wird nach Möglichkeiten gesucht, durch Kombination mit zytotoxischen Substanzen die Strahlendosis möglichst gering zu halten. TRAIL ist ein neues tumorzellspezifisches apoptoseinduzierendes Agens, ohne relevante Nebenwirkungen in Normalgewebszellen. Da Tumorzellen Resistenzmechanismen gegen TRAIL- Stimulierung entwickeln können (Caspase-8-Negativität in Gehirntumorzellen (123)), ist die alleinige TRAIL- Gabe in der Tumorbekämpfung nicht sinnvoll. Durch Kombination beider Behandlungsschemata, welche unterschiedliche Signaltransduktionswege benutzen, lassen sich potentielle Resistenzmechanismen überwinden und normales Gewebe schonen.

Vorliegende Doktorarbeit demonstriert: das FADD- Molekül wird für den Kombinationseffekt benötigt. Der Nachweis eines Kombinationseffektes in Caspase- 8 negativen Zellen, die primär wenig auf TRAIL- Rezeptorstimulation und Radiatio reagieren, zeigt die Möglichkeit auf, Resistenzmechanismen von Tumorzellen zu überwinden, zumal Caspase- 8 Negativität in einigen Tumorzelllinien nachgewiesen wurden (123).

6.1 Ausblick

In zukünftigen Versuchen sollte nun der Kombinationseffekt von TRAIL und ionisierender Strahlung *in vivo* Modellen untersucht werden, um ein neues Therapiekonzept für die Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln. Dabei sind auch Untersuchungen mit neuen agonistischen TRAIL- Rezeptorantikörpern, die bereits in klinischen Phase I und II Studien getestet werden, von großem Interesse. Ebenfalls sollte die Ursache der TRAIL- Sensibilisierung durch ionisierende Strahlung erklärt werden, deren Effekt man

einerseits in der TRAIL- Rezeptorregulation und andererseits in weiteren intrazellulären Mechanismen vermutet.

7. Literaturverzeichnis

- (1). *Kauffmann, Moser, Sauer (2001) Radiologie. Urban und Fischer München Jena*
- (2). *Frankenberg- Schwager M., Frankenberg D., Harlich R. (1987), Potentially lethal damage repair is due to the difference of DNA double strand- break repair under immediate and delayed platin. Radiation Research (United States) 111, 192-200*
- (3). *Wheeler K.T., Hickman R., Nelson G.B., Moore S.K., Wallen C.A. (1992), Relationship between DNA damage DNA repair metabolic state and cell lethality. Radiat. Environ. Biophys. 31(2), 101-115*
- (4). *Councilman W.T. (1890), Report on the etiology and prevention of the yellow fever. (ed. G.M. Sternberg) United States Marine Hospital Service, Treasury Dept. Document No 1328 (Public Health Bulletin 2), 151-159. Governement Printing Office, Washington D.C.*
- (5). *Kerr J.F.R., Wylie A.H., Currie A.R., (1972), Apoptosis: a basic biological phenomom with wide ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer, 26 (4) 239-257*
- (6). *Lauber K, Bohn E., Krober S.M., (2003), Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase- 3- mediated release of a lipid attraction signal. Cell (United States), 113(6), p717-30*
- (7). *Budtz P.E., Spies I.,(1989), Epidermal tissue homeostasis : apoptosis and cell emigration as mechanisms of controlled cell deletion in the epidermis of the toad Bufo Bufo. Cell Tissue Res. 256: 475-86*
- (8). *Defrance T., Casamayor Palleja M., Krammer P.H., (2002), The life and death of a B cell. Adv. Cancer Res 86, 195-225*
- (9). *Fisher D.E., (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the treshold. Cell 78, 539-542*
- (10). *Thompson C.B., (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267, 1456-1462*
- (11). *Los M., van de Craen M., Penning C.L., Schenk H., Westendorp M., Baeuerle*

- P.A., Dröge W., Krammer P.H., Fiers W. und Schulze-Osthoff K., (1997) Requirement of ICE/Ced-3 protease for CD-95 and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* 90, 3118-3129
- (12). Studzinski G. P. (1999) *Apoptosis a practical approach*. Oxford University Press Inc., New York
- (13). Ashkenazi A and Dixit V.M. (1998) *Death receptors : signalling and modulation* . *Science* 281: 1305- 13
- (14). Duan H., Dixit V.M. (1997) RAIDD is a new death adaptor molecule. *Nature* 385: 86-89
- (15). Pan G., Bauer J. H., Haridas V., Wang S. , Liu D., Yu G., Vincenz C., Aggarwai B.B., Ni J., Dixit V.M., (1998) Identification and functional characterization of DR 6, a novel death domain- containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431 :351-356
- (16). Yang X., Stennicke H.R., Wang B., Green D.R., Janicke R.U., Srinivasan A., Seth P., Salvesen G.S., Froelich C (1998) Granzym B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans- activation of executioner caspase-3 and -7. *J.Biol. Chem.* 273 :34278-34283
- (17). Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneider R., Green D.R., Newmeyer D.D., (2002), Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular opening in the outer membrane. *Cell* 111, 331-342
- (18). Boyd J.M., Gallo G.J., Elangovan B., Houghton A.B., Malstrom S., Avery B.J., Ebb R.G., Subromanian T., Chitten T., Lutz R.J. (1995), Bik a novel death inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival promoting protein. *Oncogene* 11(9), 1921-28
- (19). Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C., (1997) X- linked IAP is a direct inhibitor of cell-death-proteases. *Nature* 388 : 300-304
- (20). Chang D.W., Xing Z., Algeciras-Schimnick A., Barnhart B.C., Yaish-Ohad S., Peter M.E., Yang X., (2002) C-FLIP is a dual function regulator for Caspase-8 activation and CD 95-mediated apoptosis. *Embo J.* 21, 3704-3714

- (21). Sakiamoto C., Suzuki K., Hato F., (2003) *Antiapoptotic effect of granulocyte colony –stimulating factor, granulocyte-makrophage colony-stimulating factor and cyclic AMP on human neutrophils : protein synthesis dependent and protein-synthesis independent mechanisms and the role of the Janus kinase- STAT pathway. Int J Hematol., 77(1) p 60-70*
- (22). Gordon S.A., Hofmann R.A., Simmons R.L., (1997), *Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation induced apoptosis. Arch. Surg., 2132 (12), 1277-82*
- (23). Ellis R.E., Yuan J.Y. und Horvitz H.R, (1991). *Mechanisms and functions of cell death. Annu. Rev. Cell Bio. 7,663-698*
- (24). Zou H., Henzel W.J.,Liu X.,Lutschg H., Wang X., (1997) *Apaf-1, a human protein, homologous to C. elegans Ced- 4, participates in cytochrome-c dependent activation of caspase-3. Cell 90, 405-413*
- (25). Yuan J. Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., und Horvitz H.R., (1993) *The C.elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin- 1 β - converting enzyme. Cell 75, 641-52*
- (26). Hengartner M.O., Ellis R.E. und Horvitz H.R., (1992), *Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death, Nature 356, 494-499*
- (27). Adams J. M., Cory S., (1998), *The Bcl- 2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281, 1322-1325*
- (28). Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W.Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W.,(1996) Yuan J., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 87, 171*
- (29). Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferez C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D.,(1994) *Crystal structure of the cystein proteaseinterleukin-1 β - converting enzyme: a(p20p10)₂ homodimer. Cell 78, 739-750*
- (30). Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E.,Griffith J.P.,Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A.,(1994) *Structure and*

- mechanism of interleukin-1 β -converting enzyme. Nature 370, 270-275*
- (31). Rotonda J., Nicholson D.W., Fazil K.M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., Peterson E.P., Rasper D.M., Ruel R., Vaillancourt J.P.,(1996) *The three-dimensional structure of apopain/CPP 32, a key mediator of apoptosis. Nat. Struct.Biol. 3, 619-625*
- (32). Thornberry N.A., Rano T., Peterson E., Rasper D., Timkey T., Garcia, Calvo M., Houtzager V., Nordstrom P., Roy S., Vaillantcorut J., Chapman K. Nicholson D.,(1997) *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for mediators of apoptosis. J. Biol. Chem. 272, 17907-17911*
- (33). Talanian R.V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M.C., Mankovich J.A., Banach D., Ghayur T., Brady K.D., und Wong W.W.(1997), *Substrate specificities of caspase family proteases. J.Biol.Chem. 272, 9677-9682*
- (34). Varfolomeev E.E., Schuchmann M., Luria V., Chiannikulchai N., Beckmann J.S., Mett I.L., Rebrikov D., Brodianski V.M., Kemper O.C., Kollett O.,(1998), *Targeted disruption of the mouse Caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors Fas/Apo1 and DR3 and is lethal prenatally. Immunity 9, 267-276*
- (35). Zheng T. S., Schlosser S. F., Dao T., Crispe H. R., Boyer J.L., Flavell R.A (1998):, *Caspase-3 controls both cytoplasmatic and nuclear events ass Fas-mediated apoptosis in vivo. Cell Biology, 95(23): 13618-13623*
- (36). Studzinski, Blajeski A. L., Kaufmann S. H. (1999), *Apoptosis a practical approach : Methods for detecting proteolysis in intact cells. Oxford University Press, United States , 218*
- (37). Stroh C., Schulze- Osthoff, (1998), *Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. Cell death and differentiation 5, 997-1000*
- (38). Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E.,(1999) *p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 74: 957-967*
- (39). Miyashita T., Reed J. C.,(1995) *Tumor supressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell,80: 293-299*

- (40). Lemasters J. J., Qian T., Elmore S. P.(1998), *Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. Biofactors*, 8(3-4) p283-5
- (41). Petit P. X. , Susin SA, Zamzami N, et al.(1996)*Mitochondria and programmed cell death: back to the future. FEBS Lett.*, 396(1), 7-13
- (42). Bernardi P. , Broekemeier K.M. , Pfeiffer D. R.. (1994) *Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. J. Bioenerg. Biomembr.*, 26(5), 509-17
- (43). Green D.R., Reed J.C., (1998) *Mitochondria and apoptosis. Science* 281:1309-1312
- (44). Kluck R. .M., Bossy.Wetzel E., Green D. R., Newmeyer D. D.,(1997) *The release of cytochrome-c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science* 275, 1132-1136
- (45). Yang J. ,Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J. , Peng I.-I., Jones D.P., Wnag X.,(1997) *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrom c from mitochondria blocked. Science* 275, 1129-1132
- (46). Li P., Nijahawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M.,Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X.,(1997b) *Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell* 91, 479-489
- (47).Cory S.,Strasser A., Jacks T., Corcoran C.M., Metz T., Harris A.W., Adams J.M., Hall W., Hall E.(1994), *Enhanced cell survival and tumorigenesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 59, 365-75
- (48). Cory S.,(1995) *Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. Annu.Rev. Immunol*,17(4), 1029-39
- (49). Strasser A., Huang D.C.S., Vaux D.L.,(1997), *The role of Bcl-2, ced 9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death factor control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. Biochem. Biophys.Acta*, 1333(2), 151-78
- (50). Campos L., Rouault J.P., Sabido O., Oriol P., Roubi N., Vasselon C.,

Archimbaud F., Magaud J.P., Guyotat D., (1993), *High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy.* 81, 3091-3096

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

(52). Rudner J., Belka C., Marini P., Wagner J., Faltin H., Lepple- Wienhues A., Bamberg M., Budach W.,(2001), *Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells.* *Int. J. of Radiat. Biol.*;77(1):1-11

(53). Kroemer G.,(1997) *The protooncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis* , *Nature Med* 3(6),614-620

(54). Zamzami N., Marzo I., Susin S.A., Brenner C., Larochette N., Marchetti P., Reed J., Kofler R., Kroemer G., (1998), *The thiol crosslinking agent diamide overcome the inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition.* 16, 1055-1063

(55). Rudner J., Jendrossek V., Lauber K.,(2005) *Type I and type II reactions in TRAIL- induced apoptosis results from dose response studies.* *Oncogene (England)*24(1),130-140

(56). Strasser A., Harris A.W., Huang D.C.S., Krammer P.H., Cory S.,(1995), *Bcl-2 and Fas/APO1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis.* *Embo Journal* 14, 6136-6147

(57). Newton K., Harris A.W., Bath M.L., Smith K.G.C., Strasser A.(1998), *A dominant interfering mutant of FADD/Mort1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T-lymphocytes.* *Embo J.*, 17,706-718

(58). Smith K. G. C., Strasser A., Vaux D.L.,(1996) *CrmA expression in T-lymphocytes of transgenic mice inhibits CD- 95 transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease.* *Embo J.*,15,167-176

(59). Dhein J., Wlaczak H., Westerndorp M.O., Baumler C., Stricker K., Frank R., Debatin K.M., Krammer P.H.,(1995) *Molecular mechanisms of APO-1/Fas(CD-95)-mediated apoptosis in tolerance and AIDS.* *Behring Institute Mitteilungen* 96, 13-20

- (60). Nagata S. (1997). *Apoptosis by death factor. Cell* 88 355-365
- (61). Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., and Goeddel D.V., (1993), *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell* 74, 845-853
- (62). Kitson J., Raven T., Jiang Y.P., Goeddel D.V., Giles K.M., Pun K.T., Grinham C., J., Brown R., Farrow S.N.(1996) *A death domain-containing receptor that mediates apoptosis. Nature* 384, 372-375
- (63). Marsters S.A., Pitti R.M., Donahue C.J., Ruppert S., Bauer K.D., Ashkenazi A.,(1996), *Activation of apoptosis by APO-2L ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. Curr.Biol* 6, 1669-1676
- (64). Yu G.L., Lyons R.H., Garg M., Duan D.R., Xing L., Gentz R., Ni J., Dixit V.M.(1996), *Signal transducing By DR3, a death domain containing receptor related to TNFR-1 and CD95. Science* 274, 990-992
- (65). Bodmer J.L., Burns K., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Thome M., Bornand T., Hahne M., Schroter M., Becker K., (1997), *TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). Immunity* 6, 79-88
- (66)., Pan G., O'Rourke K., Chinnayan A.M., Gentz R., Ebner R., Ni J., Dixit V.M., (1997). *The receptor for cytotoxic ligand TRAIL Science* 276, 111-113
- (67). Pan G., Ni J., Wei Y.-F., Yu G.-L., Gentz R., Dixit V.M., (1997) *An antagonistic decoy receptor and a death-domain containing receptor for TRAIL, Science*277, 815-818
- (68). Schneider P., Bodmer J. L., Thome M., Hofmann K., Holler N., Tschopp J., (1997) *Characterization of two receptors for TRAIL. FEBS Letter* 416. 329-334
- (69). Sheridan J.P., Masters S.A., Pitti R.M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., Ramakrishan L., Gray C.L., Baker K., Wood W.I. (1997), *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signalling and decoy receptors. Science* 277,818-821
- (70). Fernandes- Almneri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich, F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S. (1996) *In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cystein*

protease containing two FADD-like domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7464-7469

(71). Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel, F.C., O' Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi, C., Bretz J.D., Zhang, M., Gentz R., (1996) *FLICE a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO1) death-inducing signaling complex (DISC), Cell, 85,, 817-827*

(72). Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R., Martin S.J. (1999) *Ordering the cytochrom c-initiated caspase cascade : hierarchical activation of caspases -2,-3, -6,-7,-8. J. Cell Biol., 144: 281-292*

(73). Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J., (1998) *Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, Cell 94 :491-501*

(74). Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998) *Bid a Bcl- 2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface receptors. Cell 94, 481-490*

(75). Gross A., Yin X.M., Wang K., Wei M.C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S.J., (1999) *Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome- c release, while Bcl- xl prevents this release but not tumor necrosis factor- R1/Fas death. J. Biol. Chem. 274, 1156-1163*

(76). Kluck R.M., Bossy- Wetzel E., Green D.R., Newmeyer DD (1997), *The release of cytochrome- c from mitochondria : a primary site for Bcl- 2 regulation of apoptosis. Science 275, 1129-1132*

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

(78). Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T. D., Rauch C., Smith C.A., *Identification and characterization of a new member of the TNF-family that induces apoptosis,*

Immunity 95,673-682 and –10 in a caspase-9 dependent manner . *J. Cell. Biol.*, 144, 281-292

(79). Pitti R.M., Masters S.A., Ruppert S., Donahue C.J., Moore A., und Ashkenazi A.,(1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J.Biol.Chem* , Vol.271, 1633-1636

(80). Marsters S.A., Sheridan J.P., Donahue C.J., Pitti R.M., Gray C.L., Goodard A.D., Bauer K.D., Ashkenazi A. (1996), APO-2, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF- κ B. *Curr. Bio.*, 6, 1669-1676

(81). Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., und Wallach D.,(1996) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/Apo-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 85,7795-7798

(82). Chinnaiyan A. M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P. H.,Petre M. E., und Dixit V.M.,(1996a) FADD/MORT-1 is a common mediator of CD-95 (Fas/Apo1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271,4961-4965

(83). Chinnaiyan A. M., O-Rourke K., Tewari M., Dixit V. M.,(1995) FADD a novel death-domain containing protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-51

(84). Boldin M. P., Goncharov T. M., Goltsev Y. V. und Wallach D.,(1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/ APO1 and TNF receptor-induced cell-death. *Cell* 85, 803-815

(85). Miyashita T., Kawakami A., Nakashima T.,(2004) *Clin. Exp. Immunology*, Osteoprotegerin (OPG) acts as a endogenous decoy receptorin tumor necrosis factor- related apoptosis- inducing ligand (TRAIL) –mediated apoptosis of fibroblast- like synovial cells. 137(2) 430-6

(86). Lonergan M., Aponso D., Marwin K. W., Helliwell R.J., Sato T.A., Mitchell M.D. Chiawaropongsa T., Romero R., Keelan J.A., ,(2003), Tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors and the soluble

receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. J. Clin. Endocrinol. Metab. ; 88(8), 3835-44

(87). Emery J. G., Mc Donnell P., Burke M. B., Deen K. C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E. R., Eichman C., Di Prinzio R., Dodds R. A., James I. E., Rosenberg M., Lee J. C., Young P. R. (1998), Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273, 14363-14367

(88). Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E., Rauch C.T., Juo P., Blenis J., Krammer P.H., Walczak H. (2000), FADD/MORT and Caspase-8 are recruited to TRAIL-receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor. *Immunity* 12, 599-609

(89). Walczak H., Degli-Eposti M., Johnson R.S., Smolap P.A., Waugh J.Y., Boiani N., Timour M.S., Gerhart M.J., Schooley K.A., Smith C.a., Goodwin R.G., Rauch C.T. (1997), Trail-R2 a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO Journal*, Vol.16, 5386-5397

(90). LeBlanc H.N., Ashkenazi A., (2003), Apo 2L/TRAIL and its death and decoy receptors (In process citation). *Cell Death Differ.* 10, 66-75

(91). Itho N., Nagata S., (1993). A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268, 10932-10937

(92). Degli-Esposti M.A., Dougall W.C., Smolak J.S., Waugh J.Y., Smith C.A., Goodwin R.G., (1997) The novel receptor TRAIL- R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, Vol.7, 813-820

(93). Marsters S.A., Sheridan J.P., Pitti R.M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Gurney A., Goddard A.D., Godowski P., Ashkenazi A. (1997), A novel receptor for APO-2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7, 1003

(94). Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J-L., Schröter M., Burns K., Mattmann C. (1997). Inhibition of a death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195

- (95). 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. The Journal of Immunology*, 2833-2840
- (96). Tanaka M., Suda T., Yatomi T., Nakamura N., Nagata S.,(1997), *Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with propionibacterium acnes. J. Immunology*, 158 (5), 2303-9
- (97). Lu B., Wang L., Medan D., Toledo D., Huang C., Chen F., Shi X., Rojanasakul Y.,(2002), *Regulation of Fas (CD95)- induced apoptosis by nuclear factor- kappaB and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. Am. J. Physiol. Cell. Pjysiol.*;283(3), 831-838
- (98). Ryo K., Kamogawa Y., Ikeda I., Yamauchi K., Yonehara S., Nagata S., Hayashi N., (2000), *Significance of Fas antigen- mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. Am. J. Gastroenterol*, 95 (8), 2047-55
- (99). Ashkenazi A., Pai R.C., Fong S., Leung s., Lawrence D.A., Masters S.A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A.E.,Hebert A., deForge L.,Koumenis I.L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Sharokh Z., Schwall R.,(1999) *Safety and antitumoractivity of recombinant soluble Apo2 ligand. The Journal of Clinical Investigation*,Vol.104, 155-162
- (100). Walczak H., Miller R.E., Ariail K., B., Griffith T.S., Kubin M., Chin W., Jones J., Woodward A., Le T., Smith C., Smolak P., Goodwin R.G., Rauch C.T., Schuh J.C.L., Lynch D.H.,(1999) *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in vivo. Nat. Med. Vol 5*, 157-163
- (101). Jo M., Kim T.-H., Seol D.-W., Esplen J., Dorko K., Billiar T., Strom S.C.,(2000), *Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand. Nature Medicine* ,Vol.6, 564-567
- (102).Lawrence D., Shahrok 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 A.C., Strom S.S., Kelley S., Fox J.A., Thomas D., Ashkenazi A. (2001) *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. Nature*, 383-385

(103). Schmid B., *Kombination von TRAIL und ionisierender Strahlung in Jurkat Zellen. Medizinische Dissertation Universität Tübingen*

(104). Teitz T., Wie T., Valentine M.B., Vanin E.F., Grenet J., Valentine V.A., Behm F.G., Look A.T., Laht104.i J.M., Kidd V.J., (2000), *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nature America Inc., 6(5),529-535*

(105) Jeremias I., Debatin K.M., (1998), *TRAIL induces apoptosis and activation of NF κ B. Eu.r Cytokine Netw. 9(4), 687-688*

(106). Maniatis T.,(1997) *Catalysis by a multiprotein I κ B kinase complex. Science 278, 818-819*

(107). Stancovisk I., Baltimore D.(1997), *NF kappa B activation the I kappaB kinase revealed. Cell 89(7), 1067-76*

(108). Jeremias I., Kupatt C., Baumann B., Herr I., Wirth T., Debatin K.M., (1998) *Inhibition of nuclear factor NF κ B activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. Blood 91, 4624-31*

(109). Mühlenbeck F., Haas E., Schwenzler R., Schubert G., Grel M., Smith C., Scheurich P., Wajant H.,(1998), *TRAIL/APO2L activates c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) via Caspase-dependent and caspase-independent pathways. Journal of Biological Chemistry 273, 33091-330*

(110). Schneider P., Thome M., Burns K., Bodmer j.-I., Hofmann K., kataoka T., holler N., Tschopp J.,(1997) *TRAIL Receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. Immunity , Vol.7, 831-836*

98

(111). French L.E., Tschopp J., (1999), *The TRAIL to selective tumor death. Nature America, 5(2):146-147*

(112). Bodmer J. L., Holler N., Reynard S., Vinciguerra P.Schneider P., Juo P., Blenis J., Tschopp J.,(2000) *TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. Nature Cell Biology, 2, 241-243*

(113). Kischkel F. C., Lawrence D. A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P.,

Gazdar A., Blenis J., Arnaott D., Ashkenazi A., (2001), *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in absence of caspase-8*. *J. Biol. Chem*, 10: 1074

(114). Wang J., Zeng L., Lobito A., Chan F.K., Dale J., Sneller M., Yao X., Puck J.M., Straus S.E., Lenardo M.J., (1999). *Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II*. *Cell* 98, 47-58

(115). Chinnayian A.M., Prasad U., Shankar S., Hamstra D.A., Shanaiah M., Chenevert T.L., Ross B.D., Rehemtulla A., (2000), *Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy*, *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 97 (4): 1754-1759

(116). Di Pietro R., Secchierro P., Rana R., Gibellini D., Visani G., Bemis K., Zamai L., Miscia S., Zauli G., (2001), *Ionizing radiation sensitizes erythroleucemic cells but not normal cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1*. *Blood* 97(9): 2596-2603

(117). Marini P., Schmid A., Jendrossek V., Faltin H., Daniel P.T., Budach W., Belka C., (2005) *Irradiation sensitises solid tumor cell lines to TRAIL mediated apoptosis*. *BMC Cancer*, Jan 14; 5(1):5

(118). Broaddus V.C., Dansen T.B., Abayasiriwardana K.S., Wilson S.M., Finch A.J., Swigart L.B., Hunt A.E., Evan G.I., (2004), *Bid mediates synergy between TNF- related apoptosis- inducing ligand and DNA damage*. *J. Biol. Chem.*, Dec22;p S00021-9258

(119). Belka C., Lepple- Wienhus A., Budach W., Jekle A., Los M., Lang F., Schluze- Osthoff K., Gulbins E., Bamberg M., *The tyrosine kinase is required for CD 95 independent caspase – 8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation*. *Oncogene* 1999, 50, 18 4983-4992

(120). Belka C., Rudner J., Wesselborg S., Stepczynka A., Marini P., Lepple- Wienhus A., Faltin H., Bamberg M., Budach W., Schluze- Osthoff K., *Differential role of caspase- 8 and BID activation during radiation and CD- 95 induced apoptosis*. *Oncogene* 2000, 19, 1181- 1190

(121). Ogasawara J., (1997), *Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice. Nature* 364, 806-809

(122). Havell E. A., Fiers W., North R.J., (1988) *The antitumor function of tumor necrosis factor, Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent limited by severe toxicity. J.Exp.Med.* 167, 1067-1085

(123). Grotzer M. A., Eggert A., Zuzak T. J., Janss A. J., Marwaha S., Wiewrodt B. R., Ikegaki N., Bordeur G. M., Phillips P.C., (2000) *Resistance to TRAIL- induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase- 8 expression. Oncogene* 19 (40): 4604-4610

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. M. Bamberg für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Belka für die experimentelle Betreuung und den interessanten Einblick in die Welt der radioonkologischen Forschung.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Kollegen Heidi Faltin, Angeliki Anastasakis, Justine Rudner für das angenehme Arbeitsklima.

Ebenfalls danke ich insbesondere Fr. Dr. Dr. Patrizia Marini für die Geduld bei der mehrmaligen Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Attila Cseledes danke ich für die Unterstützung am PC und für die Korrektur meiner Doktorarbeit.

Anschließend gilt mein Dank ganz besonders meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.

Lebenslauf

Geburtsdatum	21.06.1977
Geburtsort	Königstein im Taunus
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	französisch

Schulbildung

1988 – 1989	Ursulinengymnasium Mannheim
1989 – 1996	Deutsche Schule Den Haag/Abitur

Hochschulbildung

1996 - 1998	Universität zu Rostock Physikum (08.09.1998)
1998 - 2003	Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
21.09.1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.04.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufsausbildung

2002 – 2003	Praktisches Jahr im Marienhospital Stuttgart, Wahlfach Radiologie
09.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

2003 - 2005	Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Krankenhaus Wangen im Allgäu
seit 01.04. 2005	Assistenzärztin in der Diagnostischen und Interventionellen Radiologie im Klinikum Ingolstadt