

Aus der Sektion für Molekulare Onkologie
Institut für Experimentelle Tumorforschung im Krebszentrum Nord - CCC
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

UNTERSCHIEDLICHE FUNKTIONEN VON TRAIL-REZEPTOR 1 UND TRAIL-REZEPTOR 2 IN PANKREASKARZINOM-ZELLEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JOHANNES LEMKE

aus Hamburg

Kiel 2010

Referent: PD Dr. A. Trauzold
Koreferent: Prof. Dr. D. Adam
Mündliche Prüfung: 17.12.2010
Zum Druck genehmigt: 17.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	TRAIL	1
1.2	TRAIL-REZEPTOREN UND TRAIL-INDUZIERTER SIGNALWEGE	1
1.3	KLINISCHER EINSATZ VON TRAIL	5
1.4	DAS PANKREASKARZINOM	5
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	6
2.	METHODEN	8
2.1	ZELLINIEN	8
2.2	ZELLKULTUR	8
2.3	GESAMTPROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN	9
2.4	WESTERN-BLOT	10
2.5	OBERFLÄCHEN-REZEPTOREN-ANALYSE	12
2.6	SIRNA TRANSFEKTIONEN	13
2.7	KRISTALLVIOLETT-ASSAY	14
2.8	PROPIDIUM IODID FÄRBUNG	14
2.9	INTERLEUKIN-8 ELISA	15
2.10	KERNPROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN	15
2.11	ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	16
2.12	IMMUNPRÄZIPITATION	16
2.13	IMMUNFLUORESCENZ	18
2.14	VERWENDETE CHEMIKALIEN	18
3.	ERGEBNISSE	20
3.1	TRAIL-REZEPTOR-EXPRESSION	20
3.2	TRAIL INDUZIERT ZELLTOD UND IL-8	22
3.3	TRAIL-R1 VERMITTELT DIE TRAIL-INDUZIERTEN EFFEKTE	24
3.4	AGONISTISCHE TRAIL-R-ANTIKÖRPER INDUZIEREN ZELLTOD UND IL-8	27
3.5	DIFFERENTIELLE NF- κ B-INDUKTION DURCH TRAIL UND TRAIL-R-AGONISTEN	29
3.6	TRAIL-REZEPTORKOMPLEX-ANALYSE	31
3.7	BEDEUTUNG DER PKC UND MEK FÜR TRAIL-INDUZIERTER APOPTOSE	34
3.8	ZELLULÄRE LOKALISATION VON TRAIL-R1 UND TRAIL-R2	37
3.9	IDENTIFIZIERUNG VON TRAIL-REZEPTOR ASSOZIIERTEN PROTEINEN	38
4.	DISKUSSION	40

5.	AUSBLICK UND FAZIT	46
6.	ZUSAMMENFASSUNG	48
7.	LITERATURVERZEICHNIS	50
8.	DANKSAGUNG	59
9.	LEBENS LAUF	60

Abkürzungsverzeichnis

Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
BID	BH3 interacting domain death agonist
cFLIP	Cellular Flice-like inhibitory protein
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DD	Death Domain
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DR	Death Receptor
ECL	Electrochemiluminescence
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FAB	fragment antigen binding
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	FAS-associated protein with DD
FAS-L	FAS-Ligand
HRP	Horse-redish Peroxidase
IAPs	Inhibitor of apoptosis
IFN	Interferon
IL-8	Interleukin 8
IL-6	Interleukin 6
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LSM	Laser Scanning Mikroskopie
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	mitogen-activated protein kinase
NF- κ B	nuclear factor kappa B
OPG	Osteoprotegerin
PKC	Protein Kinase C
RANK-L	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
rhTRAIL	Recombinantes humanes TRAIL
siRNA	small interfering RNA
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator

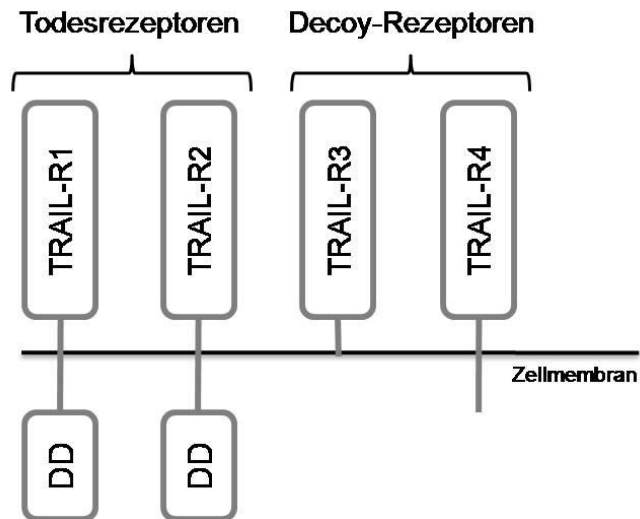
1. Einleitung

1.1 TRAIL

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ist ein Todesligand, der Apoptose selektiv in Tumorzellen induziert, normale, gesunde Zellen jedoch unbeschadet lässt (Ashkenazi et al, 1999; Walczak et al, 1999). Aufgrund seiner Sequenz-Homologie zu anderen Todesliganden wurde TRAIL in den Jahren 1995 und 1996 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert (Pitti et al, 1996; Wiley et al, 1995). TRAIL wird insbesondere von Zellen des Immunsystems als Typ-II Transmembranprotein exprimiert. Durch Proteolyse kann TRAIL von der Zellmembran gespalten werden und wird so in seine lösliche Form überführt (Tecchio et al, 2004). Die physiologische Funktion von TRAIL ist umstritten und bisher nicht vollständig geklärt. Neben Aufgaben in der Immunregulation von T-Zellen (Anel et al, 2007), der Unterdrückung von Autoimmunität (Cretney et al, 2005) und der Abwehr von Virus-Infektionen (Katsikis et al, 1997; Miura et al, 2001; Strater et al, 2002) wird TRAIL vor allem eine Rolle in der Tumorsuppression zugeschrieben. So zeigten *Sedger et al*, dass TRAIL-defiziente Mäuse schneller TRAIL-sensitive Tumoren entwickeln (Sedger et al, 2002). Weiter konnte gezeigt werden, dass IFN γ -Stimulation die TRAIL-Expression von natürlichen Killerzellen steigert und zu einem anti-metastatischen Effekt führt (Smyth et al, 2001; Takeda et al, 2002). Diese Erkenntnisse, dass TRAIL als ein endogenes Anti-Tumorprotein zu wirken scheint, weckten die Erwartung, TRAIL exogen zu applizieren und so als spezifisches Krebstherapeutikum nutzen zu können.

1.2 TRAIL-Rezeptoren und TRAIL-induzierte Signalwege

TRAIL bindet an vier membranständige Rezeptoren (siehe Übersicht TRAIL-Rezeptoren).



Übersicht TRAIL-Rezeptoren

TRAIL bindet an vier TRAIL-Rezeptoren. Die beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sind in der Lage über ihre intrazelluläre Todesdomäne (DD = Death Domain) Apoptose zu induzieren. Die beiden Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 haben keine bzw. eine trunkierte intrazelluläre Domäne und inhibieren die TRAIL-induzierte Apoptose.

1997 wurde der erste TRAIL-Rezeptor, TRAIL-R1 (DR4), identifiziert (Pan et al, 1997a). Kurz darauf wurde ein weiterer TRAIL-Rezeptor, TRAIL-R2 (DR5, Trick-2), beschrieben (Pan et al, 1997b; Screaton et al, 1997; Sheridan et al, 1997; Walczak et al, 1997). Beide Rezeptoren sind auf Proteinebene zu 58% homolog (Walczak et al, 1997) und besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne, über welche sie Apoptose induzieren können. Hierzu ist zunächst die Trimerisierung des Liganden TRAIL notwendig. Dieser bindet an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 und führt auf diese Weise zu einer Trimerisierung der Rezeptoren (Hymowitz et al, 1999; Mongkolsapaya et al, 1999). Dies führt zur Bildung des sogenannten Death-Inducing Signalling Complex (DISC). Im DISC bindet das Adapterprotein FADD mit seiner Todesdomäne an die Todesdomäne des Todesrezeptors. FADD wiederum rekrutiert Caspase-8 oder Caspase-10, welche durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (Bodmer et al, 2000; Kischkel et al, 2001; Sprick et al, 2002; Sprick et al, 2000). Aktivierte Caspase-8/-10 aktivieren zum einen direkt die Apoptose-auslösenden Effektorcaspasen, zum anderen besteht über das Protein Bid eine Verbindung zum so genannten mitochondrialen Signalweg. Hierbei transloziert Bid, nach Spaltung durch Caspase-8, in die Mitochondrienmembran und initiiert so eine Freisetzung von Cytochrom c (Luo et al, 1998). Freigesetztes Cytochrom c bildet zusammen mit dem Adapterprotein

Apaf-1 und Caspase-9 das sogenannte Apoptosom. Im Apoptosom wird Caspase-9 aktiviert. Caspase-9 wiederum aktiviert die Effektorcaspasen, die durch Aktivierung von DNAsen, Inhibierung von DNA-Reparatur-Enzymen und Spaltung von zellulären Strukturproteinen zum Zelltod führen (Rathmell & Thompson, 1999). Zellen werden als Typ-I-Zellen bezeichnet, wenn die Menge an aktivierter Caspase-8 ausreicht, um Effektorcaspasen direkt zu aktivieren. Als Typ-II-Zellen werden Zellen bezeichnet, deren Caspase-8-Aktivität nicht ausreicht, um direkt Effektorcaspasen zu aktivieren. Diese Typ-II-Zellen induzieren indirekt Apoptose über den mitochondrialen Weg durch die Spaltung von Bid (Scaffidi et al, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinom-Zellen zu den Typ-II-Zellen gehören (Hinz et al, 2000).

Gehemmt werden kann die Aktivierung von Caspase-8 bzw. Caspase-10 durch das cellular FLICE-like Inhibitory Protein (cFLIP) (Irmiler et al, 1997). Dieses ist Caspase-8-homolog, besitzt durch eine Mutation jedoch keine Apoptose-induzierende Aktivität. cFLIP bindet wie Caspase-8 an FADD und hemmt so kompetitiv die Bindung von Caspase-8/-10 und somit die Bildung des funktionellen DISC.

Neben den beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 bindet TRAIL an zwei weitere membranständige Rezeptoren: TRAIL-R3 und TRAIL-R4 (Degli-Esposti et al, 1997a; Degli-Esposti et al, 1997b; MacFarlane et al, 1997; Mongkolsapaya et al, 1998; Pan et al, 1997b; Pan et al, 1998). Die extrazelluläre Domäne beider Rezeptoren hat große Ähnlichkeit mit den Domänen von TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Im Gegensatz zu den beiden Todesrezeptoren besitzt TRAIL-R3 jedoch keine und TRAIL-R4 lediglich eine trunkeerte Todesdomäne (siehe Übersicht TRAIL-Rezeptoren). Infolgedessen können beide Rezeptoren keine Apoptose induzieren. Im Gegenteil, es konnte gezeigt werden, dass diese sogenannten Decoy-Rezeptoren auf drei verschiedenen Wegen TRAIL-induzierte Apoptose hemmen können:

- 1) TRAIL-R3 und -R4 hemmen die Todesrezeptoren kompetitiv durch die Bindung von TRAIL. Beide werden auch als Decoy-Rezeptoren bezeichnet (engl. Decoy = Lockvogel), da sie TRAIL abfangen und so die Bindung an die Todesrezeptoren verhindern (Degli-Esposti et al, 1997b).

- 2) TRAIL-R4 bildet Komplexe mit TRAIL-R2 und hemmt so die Apoptose-induzierende Aktivität des TRAIL-R2 (Merino et al, 2006).
- 3) Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL-R4 mit seiner trunkeierten intrazellulären Domäne zwar keine Apoptose induzieren kann, aber in der Lage ist, den anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren und somit indirekt die TRAIL-vermittelte Apoptose zu hemmen (Degli-Esposti et al, 1997a).

Mit Osteoprotegerin (OPG) existiert ein löslicher TRAIL-Rezeptor, der prinzipiell auch als Decoy-Rezeptor fungieren kann (Emery et al, 1998; Pritzker et al, 2004). Wegen seiner geringen Affinität zu TRAIL bei physiologischen Temperaturen bleibt seine Rolle in TRAIL-induzierten Signalwegen jedoch unklar (Truneh et al, 2000). Eine deutlich höhere Affinität hat OPG zum Osteoprotegerin-Liganden (RANK-L). Zusammen übernehmen beide als Osteoklastenhemmer eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel (Simonet et al, 1997).

Neben Apoptose induziert TRAIL auch nicht-apoptotische Signalwege, welche die TRAIL-induzierte Apoptose hemmen können – unter anderem NF- κ B. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in Immun-, Entzündungs- und Zellwachstumsprozessen spielt. Es wurde gezeigt, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 NF- κ B aktivieren (MacFarlane, 2003). NF- κ B wiederum induziert die Expression verschiedener anti-apoptotischer Proteine wie cFLIP, Bcl-x_i, IAPs und TRAIL-R3 und hemmt somit Apoptose (Wajant, 2004). Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass TRAIL NF- κ B sowie weitere nicht-apoptotische Signalwege wie PKC (Proteinkinase C) und MAPK (mitogen-activated protein kinases) auch in Pankreaskarzinom-Zellen aktiviert (Siegmond et al, 2007; Trauzold et al, 2001). Diese induzieren die Expression von pro-inflammatorischen und Invasions-fördernden Proteinen wie IL-6, IL-8 und uPA (Trauzold et al, 2006). Welche dramatischen Auswirkungen dies haben könnte, wurde deutlich, da gezeigt werden konnte, dass die Behandlung von Apoptose-resistenten PancTul-Zellen mit TRAIL zu gesteigerter Invasivität *in vitro* und Metastasierung *in vivo* führt (Trauzold et al, 2006). Zurzeit zeigen mehr und mehr Arbeiten, dass TRAIL nicht nur Apoptose in Tumorzellen induziert, sondern auch eine entscheidende Rolle in Invasions-,

Metastasierungs- und Proliferationsprozessen spielen kann (Ishimura et al, 2006; Levina et al, 2008).

1.3 Klinischer Einsatz von TRAIL

Todesliganden wie TRAIL, TNF α und FAS-Ligand bieten hoffnungsvolle, potentielle Therapieoptionen für Krebserkrankungen, da sie Apoptose selektiv in Tumorzellen induzieren können. Der systemische Einsatz von FAS-Ligand und TNF α führt allerdings zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen wie schwerer Leberschädigung (FAS-Ligand) und septischen Krankheitsbildern (TNF α) (Feinberg et al, 1988; Ogasawara et al, 1993). Rekombinantes TRAIL hingegen zeigte in präklinischen Untersuchungen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen (Ashkenazi et al, 1999; Kelley et al, 2001). Die initiierte Phase-1 Studie zeigte, dass TRAIL ohne schwere Nebenwirkungen appliziert werden kann (Herbst, 2006). Zurzeit wird rekombinantes TRAIL in Phase-2 Studien in der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms und des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms evaluiert (Ashkenazi & Herbst, 2008).

Neben TRAIL können auch agonistische TRAIL-R-Antikörper zur Krebstherapie eingesetzt werden. Die agonistischen TRAIL-R-Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 werden bereits klinisch evaluiert. HGS-ETR1 (Mapatumumab) aktiviert selektiv TRAIL-R1. Die Evaluation von HGS-ETR1 in Phase-1 Studien zeigte, dass dieser ohne schwere Nebenwirkungen systemisch verabreicht werden kann und Apoptose in vielen Tumor-Zellen induziert (Hotte et al, 2008). Zurzeit wird HGS-ETR1 in Phase-2 Studien zur Monotherapie des Non-Hodgkin-Lymphoms, des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des Kolonkarzinoms erprobt (Ashkenazi & Herbst, 2008; Greco et al, 2008). Der agonistische TRAIL-R-Antikörper HGS-ETR2 (Lexatumumab) aktiviert selektiv TRAIL-R2. Dieser Antikörper wurde bisher in einer Phase-1 Studie evaluiert (Plummer et al, 2007). Zusätzlich wurden zahlreiche Studien initiiert, in denen TRAIL oder TRAIL-R-Agonisten mit Chemotherapeutika kombiniert wurden (Ashkenazi & Herbst, 2008).

1.4 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein hochmaligner Tumor der Bauchspeicheldrüse, welcher weltweit mit einer Inzidenz von 10-20/100.000 vorkommt (Bruch et al, 2006).

Histologisch ist das vom Drüsenepithel ausgehende duktale Adenokarzinom mit 92% die häufigste Form (Böcker et al., 2004). Aufgrund wenig charakteristischer Symptome wird das Pankreaskarzinom oftmals erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist bei zwei Drittel aller Patienten bereits ein organüberschreitendes Wachstum oder eine Metastasierung nachweisbar. So kommen für den kurativen Therapieansatz der Tumorresektion nur 20-30% der Patienten in Frage (Bruch et al, 2006). Insgesamt hat das Pankreaskarzinom eine infauste Prognose. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei nur 5% (Jemal et al, 2008). Neben der späten Diagnosestellung sind hierfür vor allem ein hohes metastatisches Potential und Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapie verantwortlich (Bardeesy & DePinho, 2002).

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren konnten durch neue adjuvante Therapiemodelle mit Radio-, Chemo- und Immuntherapie die Mortalität und Morbidität von vielen Krebserkrankungen gesenkt werden. Das Pankreaskarzinom jedoch hat auch heute trotz immenser Bemühungen eine sehr schlechte Prognose. Mit der Entdeckung von TRAIL und der Entwicklung von TRAIL-R-Agonisten stehen hoffnungsvolle neue Therapieoptionen zur Verfügung, von denen insbesondere auch Pankreaskarzinom-Patienten profitieren könnten.

Wie beschrieben, startet TRAIL in Tumorzellen jedoch nicht nur ein Selbstzerstörungsprogramm, sondern kann auch zu dramatischen, unerwünschten Effekten wie Metastasierung und Tumorprogression führen. Dies zeigt zum einen die Komplexität der durch TRAIL induzierten Signalwege, zum anderen macht es aber auch deutlich, dass ein detailliertes Verständnis dieser Signalwege für einen sicheren therapeutischen Einsatz von TRAIL notwendig ist. Zur Komplexität der TRAIL-Thematik trägt insbesondere der Umstand bei, dass TRAIL nicht an einen Rezeptor bindet, sondern an vier, davon an zwei Todesrezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, die Apoptose induzieren können. Beide Rezeptoren sind auf der Proteinebene zu 58% identisch und bisher konnten keine eindeutigen funktionellen Unterschiede beschrieben werden. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der TRAIL-induzierten Signalwege leisten, indem die möglichen

unterschiedlichen Funktionen der beiden Todesrezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, in Pankreaskarzinom-Zellen untersucht werden.

Zu Beginn der Arbeit soll zunächst die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in Pankreaskarzinom-Zellen analysiert werden. Weiter soll mit Hilfe von inhibitorischen Rezeptor-spezifischen Reagenzien sowie Rezeptor-Agonisten geklärt werden, über welchen TRAIL-R die apoptotische und nicht-apoptotische Antwort vermittelt wird. Abschließend sollen über Immunpräzipitationsexperimente mögliche neue TRAIL-R interagierende Proteine identifiziert werden.

2. Methoden

2.1 Zelllinien

Bei den untersuchten Zelllinien handelt es sich um humane Pankreasadenokarzinom-Zellen. Folgende Zelllinien wurden untersucht: Colo357, Panc89, PancTul und BxPC3.

2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in 25cm², 75cm² oder 175cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) mit Kulturmedium versetzt im Brutschrank bei 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit bei 37°C kultiviert. Das verwendete Kulturmedium bestand aus RPMI 1640 versetzt mit 10% FCS, 2mM Glutamat und 1mM Natrium-Pyruvat. Alle Zelllinien wuchsen einschichtig adhärent.

Tabelle 1: Bezugsquellen Zellkulturmedien und Zusätze

Kulturmedium und Zusätze	Hersteller
RPMI 1640 Kulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (fetales Kälberserum)	Pan Biotech, Aidenbach
Glutamat	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Accutase	PAA, Cölbe

Bei einer Zelldichte von 80-90% wurden die Zellen geteilt. Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin wurden die Zellen bis zum vollständigen Ablösen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe äquivalenter Mengen Kulturmedium inaktiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 Minuten, 1400rpm, 18°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und für entsprechende Experimente ausgesät oder neu kultiviert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Zellzahlmessgerät Casy TT (Innovatis, Bielefeld)

nach Angaben des Herstellers. In Stimulationsexperimenten wurden Zellen mit folgenden Reagenzien behandelt:

Tabelle 2: Bezugsquellen Stimulantien und Inhibitoren

Stimulation / Inhibitoren	Hersteller
rhTRAIL	R&D Systems, Wiesbaden
HGS-ETR1 (Mapatumumab)	Human Genome Science, USA
HGS-ETR2 (Lexatumumab)	Human Genome Science, USA
UO126 (MEK-Inhibitor)	Promega, Mannheim
GÖ6983 (PKC-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt

2.3 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Die Gesamtproteinextraktion erfolgte mittels RIPA-Puffer. Hierzu wurde der Überstand der Zellen abgenommen, die Zellen mit 4°C-kaltem PBS gewaschen, mit RIPA-Puffer (4°C, 130µl pro 6-Well) versetzt und anschließend für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Für eine effizientere Lyse wurden die Zellen anschließend für eine Stunde bei -20°C eingefroren, auf Eis wieder aufgetaut, die Zellen manuell abgelöst und für 10 Sekunden sonifiziert. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 14200rpm, 4°C) wurde der Überstand (Lysat) gesichert. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer:

Tris-Base (pH 7,4) 50mM

NaCl 150mM

NP40 1%

Na-Desoxycholat 1%

SDS 0,1%

Complete Protease-Inhibitor Cocktail pro 50ml Puffer

PhosSTOP Phosphatase Inhibitor pro 10ml Puffer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von RIPA-Lysaten wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.4 Western-Blot

Der Nachweis von Proteinen im Gesamtzelllysat erfolgte aus RIPA-Lysaten.

2.4.1 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Verwendung fanden hierfür 4-20% Tris-Glycin-Gel 1mm x 10/12 Well (Invitrogen, Karlsruhe). Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben wurde innerhalb eines Gels für alle Proben die gleiche Menge Protein eingesetzt. Gegebenenfalls abweichendes Volumen wurde mit RIPA-Puffer ausgeglichen. Jede Probe wurde mit einfach Lämmli-Puffer versetzt, für fünf Minuten zur Denaturierung im Heizblock auf 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 125V mittels Laufpuffer in einer Novex Mini Cell Gelkammer (Invitrogen, Karlsruhe). Auf jedem Gel lief neben den aufgetragenen Proben ein Marker (Rainbow-Marker, GE-Healthcare, München) zur Molekulargewichtsbestimmung der nachgewiesenen Proteine mit.

Lämmli-Puffer 4fach (pH 6,8)

Tris-HCl 2M	1,25ml
SDS 10%	8ml
DTT	308,5mg
Glycerin	2,02ml
Bromphenolblau	2mg

Lauf-Puffer 10fach (pH 8,3)

Tris-Base	302,9g
Glycin	1440,9g
SDS 10%	1l
Aquadest	ad 10l

2.4.2 Membrantransfer

Der Membrantransfer erfolgte in einer mit Blotting-Puffer gefüllten Mini Trans Blot Cell Blottingkammer (Bio-Rad, München). Der Blottingkammer-Einsatz wurde wie

folgt bestückt: zwischen zwei Whatman 3MM Blotting-Papiere (GE-Healthcare, München) wurde auf das Gel eine Immobilon-P PVDF Membran (Millipore, Schwalbach) platziert, die zuvor fünf Minuten in Methanol 100% aktiviert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen wurde. Der Blottingkammereinsatz wurde so geschichtet und in die Blottingkammer eingesetzt, dass das Gel zur Anode und die Membran zur Katode gerichtet waren. Der Proteintransfer erfolgte für 90 Minuten bei 400mA.

Blottingpuffer 10fach:

Glycin	1426g
Tris-Base	1211,4g
Methanol	20%
Aquadest	ad 10l

2.4.3 Blockierung und Immunodetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in 5%iger Magermilch schüttelnd bei Raumtemperatur blockiert.

Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 0,5%iger Magermilch mit dem primären Antikörper in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten mit T-BST bei Raumtemperatur schüttelnd gewaschen. Es folgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 0,5%iger Milch in der vom Hersteller angegebenen Konzentration. Anschließend wurde die Membran nach oben beschriebenen Schema gewaschen. Als Substrat wurden ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, München) verwendet, mit dem die Membran für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. In der Dunkelkammer wurde anschließend ein ECL-Chemiluminiszenz-Hyperfilm (GE Healthcare, München) mit der Membran belichtet und mittels Curix 60-Filmentwickler (AGFA, Gera) entwickelt. Die jeweilige Dauer der Exposition des Röntgenfilmes war abhängig von der Signalstärke des nachgewiesenen Proteins.

T-BST 10fach (pH 7,6)

Tris-Base	242g
NaCl	800g
Aquadest	ad 10l
Tween 20	1%

Tabelle 3: Bezugsquellen Primär-Antikörper Western-Blot

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich, München
Anti-TRAIL-R1	Kaninchen	Chemicon, Schwalbach
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-TRAIL-R3	Kaninchen	Chemicon, Schwalbach
Anti-TRAIL-R4	Kaninchen	Chemicon, Schwalbach
Anti-TRAIL	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Osteoprotegerin	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-Caspase-8	Maus	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-Caspase-10	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-cFLIP	Kaninchen	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Histon-H3	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-αTubulin	Kaninchen	Epitomics, Hamburg

Tabelle 4: Bezugsquellen Sekundär-Antikörper Western-Blot

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG (HRP-gekoppelt)	Ziege	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-Maus IgG (HRP-gekoppelt)	Ziege	Cell Signaling, Frankfurt a. M.

2.5 Oberflächen-Rezeptoren-Analyse

Der Nachweis von TRAIL-Rezeptoren auf der Oberfläche von Pankreaskarzinom-Zellen oder Jurkat-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS).

$2,8 \times 10^5$ adhärent wachsende Pankreaskarzinom-Zellen wurden pro 6-Well ausgesät, nach 24 Stunden mit PBS gewaschen, in 2ml Accutase abgelöst und durch behutsames Resuspendieren vereinzelt. Nach Zentrifugation (5min, 1420rpm, 18°C)

wurden die Zellen mit PBS 0,05% Natriumazid gewaschen. Jurkat-Zellen wurden abzentrifugiert und gleichfalls mit PBS 0,05% Natriumazid gewaschen. Für den Rezeptor-Nachweis wurden jeweils 4×10^5 der Zellen mit dem primären Antikörper (eingesetzte Konzentration 1:100) in 100 μ l PBS 1% BSA für 1 Stunde bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Probe dreimal mit 1ml PBS 0,05% Natriumazid gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit dem Biotin-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (eingesetzte Konzentration 1:50) in 100 μ l PBS 1% BSA für eine Stunde lichtgeschützt bei 4°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde das Pallet in 50 μ l PBS 0,05% BSA mit 20 μ l Streptavidin-PE (BD Biosciences, Heidelberg) inkubiert. Es folgte erneut dreimaliges Waschen. Das Pallet wurde anschließend in 300 μ l PBS 1% Paraformaldehyd gelöst. Bis zur Messung wurde die Probe in Dunkelheit bei 4°C aufbewahrt. Als Kontrolle wurde eine Maus-IgG1-Isotyp-Kontrolle (Dako, Hamburg) mitgeführt. Die Durchflusszytometrie wurde mittels FACScan (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt und mittels Cell Quest Software (BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen analysiert.

Tabelle 5: Bezugsquellen FACS-Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-TRAIL-R1 (HS101)	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-TRAIL-R2 (HS201)	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-TRAIL-R3 (HS301)	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-TRAIL-R4 (HS401)	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-Maus (Biotin-gekoppelt)	Ziege	Sigma-Aldrich, München

2.6 siRNA Transfektionen

Mittels siRNA-Experimenten wurde die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 inhibiert. siRNA-Reagenzien wurden von Dharmacon (Thermo Scientific, Schwerte) bezogen. Jeweils $2,8 \times 10^5$ Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 75nM siRNA mittels Lipofektion für 40 Stunden transfiziert. Für die Transfektion wurde siPort NeoFX (Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Kontrolle wurde jeweils parallel mit nicht zielgerichteter Kontroll-siRNA transfiziert.

2.7 Kristallviolett-Assay

Die Vitalitätsbestimmung der Pankreaskarzinom-Zellen erfolgte mittels Kristallviolett-Assay. Zunächst wurden 1×10^4 Zellen pro Well auf einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen je nach Experiment (wie unten beschrieben) behandelt oder stimuliert. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit neuem Zellkultur-Medium versetzt. Nach 16 Stunden erfolgte die Kristallviolett-Färbung. Hierzu wurde zunächst der Zellüberstand abgenommen und für die IL-8 Bestimmung mittels ELISA gesichert. Pro 96-Well wurden die Zellen mit 50 μ l Kristallviolettlösung versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Kristallviolettlösung entfernt, die Zellen fünfmal mit je 200 μ l destilliertem Wasser pro 96-Well gewaschen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Am nächsten Morgen wurden 200 μ l Methanol in jedes Well gegeben und bis zur vollständigen Lösung des Kristallviolett-Farbstoffes schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei 590nm. Die gemessene Extinktion der vitalen Kontrollzellen, die das Kristallviolett aufgenommen haben, wurde gleich 100% Vitalität gesetzt. Die Vitalität von behandelten Zellen wurde prozentual in Relation zu den Kontrollzellen berechnet.

Kristallviolettlösung:

Kristallviolett	0,5%
Methanol	20%
Aquadest	80%

2.8 Propidium Iodid Färbung

Die Vitalitätsbestimmung für nicht-adhären wachsende Jurkat-Zellen erfolgte mittels Propidium Iodid Färbung und anschließender Durchflusszytometrie. Propidium Iodid überwindet die Zellmembran nicht-vitaler Zellen, nicht aber von vitalen Zellen. Auf diese Weise kann der Anteil vitaler Zellen einer Zellpopulation bestimmt werden. Für die Vitalitätsbestimmungen wurden zunächst 5×10^5 Zellen pro 12-Well in 1ml Medium ausgesät und laut Experiment behandelt. Zum Zeitpunkt der Vitalitätsbestimmung wurde die Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt, abzentrifugiert (1500 rpm, 18°C, 5min) und zweimal mit PBS 5mM EDTA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen

mit 200µl PBS 5mM EDTA mit 2µg/ml Propidium Iodid versetzt. Anschließend wurde die Anzahl der vitalen Zellen mittels FACScan (BD Biosciences, Heidelberg) bestimmt.

2.9 Interleukin-8 ELISA

Die IL-8-Konzentration im Zellüberstand wurde mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Verwendet wurde der IL-8 DOU SET ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) nach Angaben des Herstellers. Die absolute IL-8-Konzentration wurde als Induktion zur Kontrolle berechnet.

2.10 Kernproteinextraktion aus Zellen

Es wurden $2,8 \times 10^5$ Zellen pro 6-Well ausgesät und nach 24 Stunden entsprechend des Experimentes stimuliert. Zur Kernproteinextraktion wurde das Medium abgenommen und die Zellen zunächst mit 2ml PBS (4°C) gewaschen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zur zytoplasmatischen Lyse wurden 500µl EMSA-I-Puffer in jedes 6-Well gegeben, die Zellen abgelöst und in 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt. Diese wurden zentrifugiert (5 Minuten, 14200rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zur Lyse der Zellkerne wurde das Pallet mit 20µl EMSA-II-Puffer resuspendiert und schüttelnd für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert (5 Minuten, 14200rpm, 4°C), der Überstand als Kernproteinextrakt gesichert und bei -80°C bis zum EMSA aufbewahrt.

EMSA-I-Puffer (Zytosolextraktion):

Hepes	10mM
KCl	10mM
EDTA	0,2mM
DDT	1mM

EMSA-II-Puffer (Kernextraktion):

Hepes	20mM
NaCl	0,4M
EDTA	0,4mM
DTT	1mM

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von EMSA-Lysaten wurde der DC ProteinAssay (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für den Nachweis der NF- κ B-Aktivierung wurde das Gelshift™ NF- κ B (Carcinoma) Kid (Active Motif, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurden die Kernextrakte mit einem ³²P-gelabeltem Oligonukleotid mit einer NF- κ B-Bindungsstelle für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch in einem nativen 6% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Mit dem getrockneten Gel wurde ein ECL-Chemiluminiszenz-Hyperfilm (GE Healthcare, München) belichtet und mittels Curix 60-Filmentwickler (AGFA, Gera) entwickelt

2.12 Immunpräzipitation

2.12.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen – Immunpräzipitations-Lysat

Die Zellen wurden am Vortag in einer T175-Zellkulturflasche ausgesät und nach 24 Stunden bei einer Konfluenz von 80-90% entsprechend dem Experiment stimuliert. Zur Lyse wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1,5ml IP-Lysispuffer pro T175-Zellkulturflasche lysiert, in 2ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (5min, 5000rpm, 4°C und anschließend 30min, 14200rpm, 4°C) und der Überstand gesichert.

IP-Lysis-Puffer:

Tris-Base 1M (pH 7,4)	3ml
NaCl 2M	6ml
Glycerin	10ml
Triton	1ml
Aquadest	ad 100ml
Complete Protease-Inhibitor Cocktail pro 50ml Puffer	
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor pro 10ml Puffer	

2.12.2 Immunpräzipitation mit HGS-ETR1 und HGS-ETR2

Zur Präzipitation wurden jeweils 40µl Protein G Sepharose Beads 4 Fast Flow (GE Healthcare, München) in ein 2ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und nach kurzer Zentrifugation das Ethanol, in dem die Protein G Sepharose vorliegt, abgenommen. Vor der Immunpräzipitation wurden jeweils 300µl Lysat pro lysierter T175-Flasche abgenommen und gesichert. Das verbleibende Lysat einer lysierten Flasche wurde jeweils in eines der vorbereiteten Eppendorf-Gefäße gegeben. Zu dem Lysat der nicht-stimulierten und TRAIL-stimulierten Zellen wurden jeweils 10µg HGS-ETR1 oder 10µg HGS-ETR2 als Präzipitations-Antikörper dazugegeben. In den Lysaten der mit HGS-ETR1 bzw. HGS-ETR2 stimulierten Zellen diente der Stimulationsantikörper als Präzipitationsantikörper. Für den Nachweis unspezifischer Banden im Proteinnachweis wurden Antikörperkontrollen mitgeführt. Hierzu wurden jeweils 10µg HGS-ETR1 und 10µg HGS-ETR2 zu 1,5ml IP-Lysispuffer pipettiert und analog zu den Lysat-Proben behandelt. Für die Inkubation von Lysat, Antikörper und Protein G Sepharose wurden die Eppendorf-Gefäße über Nacht bei 4°C drehend invertiert. Nach 24 Stunden wurden die Eppendorf-Gefäße zentrifugiert (1min, 5000rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Protein G Sepharose fünfmal mit jeweils 1,5ml IP-Lysispuffer gewaschen. Nach den Waschvorgängen wurde die Protein G Sepharose in 60µl IP-Lysispuffer und 40µl Lämmli 4fach aufgenommen und zwölf Minuten bei 80°C auf dem Heizblock erhitzt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen, gesichert und bis zum Nachweis mittels Western-Blot-Technik bei -20°C aufbewahrt.

2.13 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis der TRAIL-Rezeptor-Lokalisation wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt.

Es wurden $2,8 \times 10^5$ Zellen pro 6-Well auf Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen dreimal mit PBS (4°C) gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 10 Minuten mit jeweils 1ml Methanol (-20°C) bei Raumtemperatur inkubiert, erneut zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und jeweils mit 1 ml PBS 0,5% BSA für 15 Minuten blockiert. Anschließend wurden die entnommenen Deckgläser in einer befeuchteten Kammer mit dem primären Antikörper gegen TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 in jeweils 70µl PBS 0,5% BSA auf Parafilm für 45 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser 3-mal mit PBS 0,5% BSA gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Hoechst 33258 (Biomol, Hamburg) zur Kernfärbung in 70µl PBS 0,5% BSA für 45 Minuten. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser zweimal mit PBS 0,5% BSA und anschließend noch einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden mit jeweils 15µl Mounting-Lösung (dianova, Hamburg) auf einem Objektträger fixiert. Die Färbung wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Axioplan 2, Zeiss, Jena) visualisiert.

Tabelle 6: Bezugsquellen Immunfluoreszenz-Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-TRAIL-R1 (HS101)	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-TRAIL-R2 (HS201)	Maus	Alexis Biochemicals, Lörrach
Alexa Flour 546 anti-mouse IgG	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe

2.14 Verwendete Chemikalien

Tabelle 7: Bezugsquellen verwendeter Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Bromphenolblau	LKB Bromma, Schweden
Complete Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München

DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hepes	Sigma-Aldrich, München
KCl (Kalium Chlorid)	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Na-Dexocholat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, München
SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate)	AppliChem, Darmstadt
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Triton	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Merck, Darmstadt

3. Ergebnisse

3.1 TRAIL-Rezeptor-Expression

Zunächst wurde die TRAIL-Rezeptor-Expression verschiedener Pankreaskarzinom-Zelllinien (Colo357, PancTu1, Panc89 und BxPC3) untersucht. Hierbei konnten im Gesamtzelllysat aller dieser Zelllinien alle vier TRAIL-Rezeptoren nachgewiesen werden (Abbildung 1-A).

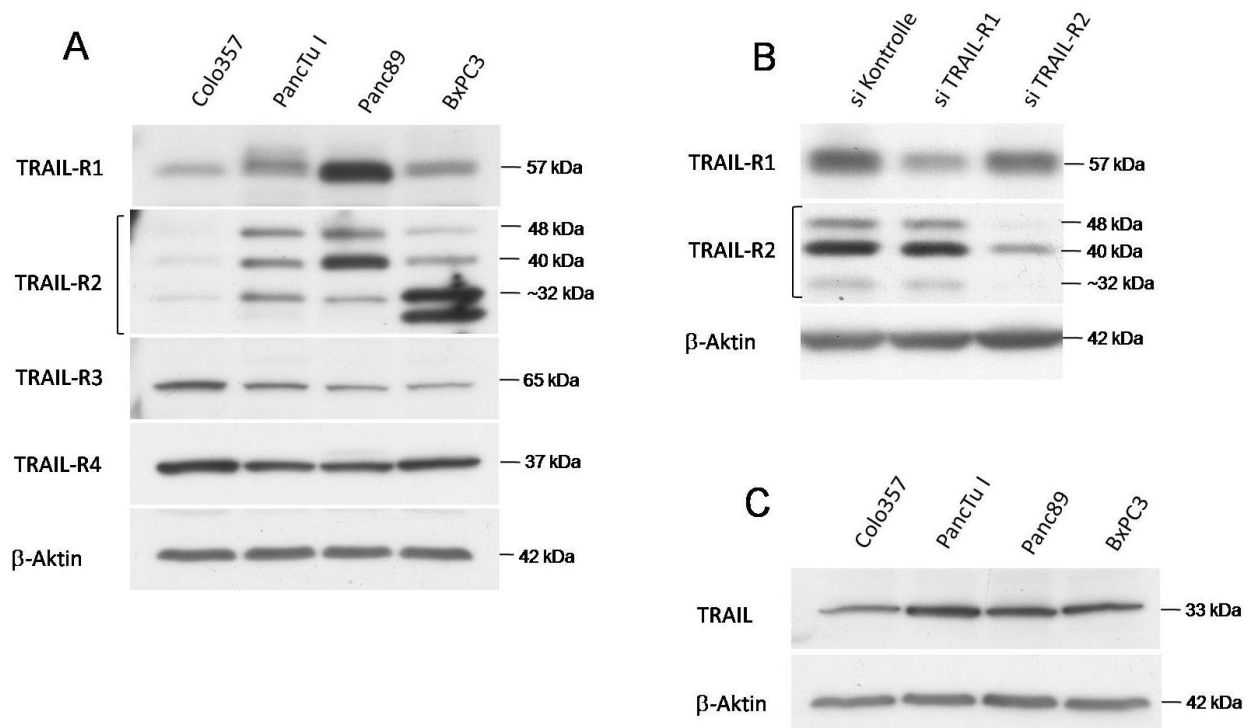


Abbildung 1: Analyse der TRAIL-Rezeptor- und TRAIL-Expression

A) Western-Blot-Analyse der TRAIL-Rezeptor-Expression im Gesamtzelllysat der Pankreaskarzinom-Zellen Colo357, PancTu1, Panc89 und BxPC3. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von β-Aktin bestimmt.

B) Inhibition von TRAIL-R1- und TRAIL-R2-Expression mittels siRNA: Panc89-Zellen wurden mit siRNA gegen TRAIL-R1, gegen TRAIL-R2 oder mit Kontroll-siRNA für 40 Stunden transfiziert. Aus dem erstellten Gesamtzelllysat wurde die TRAIL-Rezeptor-Expression mittels Western-Blot-Technik analysiert. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von β-Aktin bestimmt.

C) Western-Blot-Analyse der TRAIL-Expression im Gesamtzelllysat der Pankreaskarzinom-Zellen Colo357, PancTu1, Panc89 und BxPC3. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von β-Aktin bestimmt.

Der für den TRAIL-R2-Nachweis eingesetzte Antikörper detektiert die beiden bekannten Splice-Varianten des Rezeptors (40kDa und 48kDa). Beide Formen konnten in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte in allen Zelllinien eine dritte, spezifische Bande in Höhe von ~32kDa nachgewiesen werden. In der Zelllinie BxPC3 konnte eine zusätzliche vierte, kleinere Bande nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine Form des TRAIL-R2 handelt, wurden Transfektionsexperimente mit siRNA gegen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 durchgeführt (Abbildung 1-B). Hierbei zeigte sich, dass nach Transfektion mit siRNA gegen TRAIL-R2 in Panc89-Zellen nicht nur die Expression der beiden bekannten Splice-Varianten dramatisch reduziert wurde, sondern auch die Intensität der nachgewiesenen dritten Bande (Abbildung 1-B). Die spezifische Hemmung der TRAIL-R1-Expression hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Intensität aller nachgewiesenen TRAIL-R2-Banden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die untersuchten Zelllinien eine weitere, kleinere TRAIL-R2-Form exprimieren.

Zusätzlich konnte in allen Zelllinien eine TRAIL-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 1-C). Ein möglicher Einfluss des endogenen TRAIL muss folglich bei der Interpretation anschließender Ergebnisse berücksichtigt werden.

Da der Nachweis der TRAIL-Rezeptoren im Gesamtzelllysat die Rezeptor-Expression in allen Zellkompartimenten erfasst, für die Stimulation von außen jedoch die Lokalisation auf der Zelloberfläche entscheidend ist, wurde zusätzlich die Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 2).

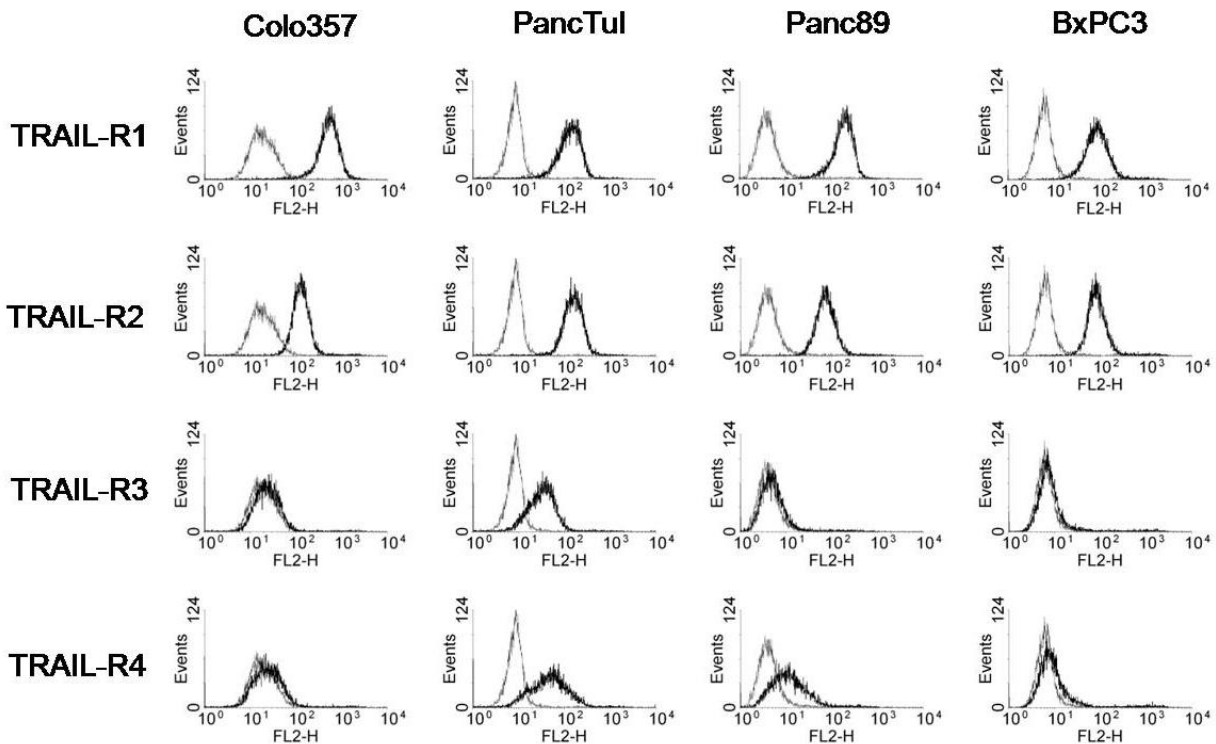


Abbildung 2: Analyse der Oberflächen-Expression von TRAIL-Rezeptoren

Analyse der Oberflächen-Expression der TRAIL-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie auf Colo357-, PancTul-, Panc89- und BxPC3-Zellen. Auf der Ordinate sind die Zell-Counts, auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität (FL2-H) aufgetragen. Die dünne Kurve zeigt die Isotypkontrolle (IgG1), die stärkere Kurve den jeweiligen TRAIL-Rezeptor-Nachweis.

Hierbei konnte eine Expression der beiden Todesrezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) auf der Zelloberfläche aller vier Zelllinien nachgewiesen werden. Der Nachweis der Oberflächenexpression der Decoy-Rezeptoren zeigte, dass TRAIL-R3 von PancTul-Zellen und TRAIL-R4 von Panc89- und PancTul-Zellen exprimiert wird. Auf der Oberfläche von Colo357- und BxPC3-Zellen konnte keine Decoy-Rezeptor-Expression detektiert werden, obwohl in beiden Zelllinien TRAIL-R3 und TRAIL-R4 im Gesamtzelllysat nachgewiesen werden konnten (vergleiche Abbildung 1-A und 2).

3.2 TRAIL induziert Zelltod und IL-8

Im Anschluss an die dargestellten Expressions-Experimente wurden der Zelltod und die nicht-apoptotische Antwort nach TRAIL-Behandlung in den beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien Colo357 und Panc89 untersucht.

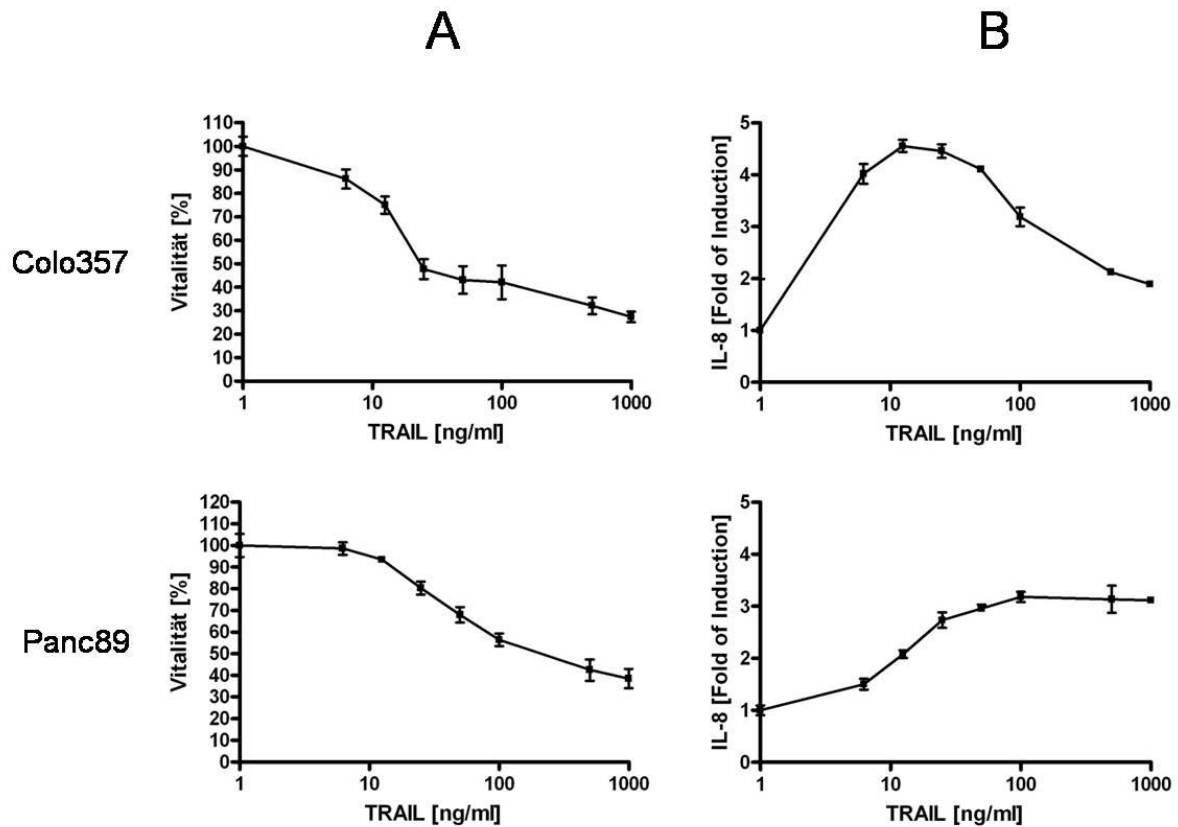


Abbildung 3: Untersuchung der apoptotischen und nicht-apoptotischen Wirkung von TRAIL

Colo357- und Panc89-Zellen wurden mit den angegebenen TRAIL-Konzentrationen behandelt. Nach 16 Stunden wurden die Vitalität (3-A) mittels Kristallviolett-Assay und die IL-8-Konzentration (3-B) im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt.

Die in Abbildung 3-A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass TRAIL-Behandlung in beiden untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien dosisabhängig Zelltod induzierte. In Übereinstimmung mit bereits vorangegangenen Untersuchungen zeigten sich Colo357-Zellen sensitiver als Panc89-Zellen (Trauzold et al, 2003). Interessanterweise korrelierte dies nicht mit der Expression der Todesrezeptoren, da Colo357-Zellen weniger TRAIL-R1 und TRAIL-R2 exprimieren als Panc89-Zellen (vergleiche Abbildung 1-A)

Neben Zelltod kann TRAIL-Stimulation auch eine nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Antwort in Pankreaskarzinom-Zellen induzieren (Trauzold et al, 2006). In vorliegender Arbeit wurde stellvertretend für diese die IL-8-Induktion

bestimmt. Wie die Abbildung 3-B zeigt, führte TRAIL-Stimulation in den Zelllinien zu einer dramatischen IL-8-Induktion.

3.3 TRAIL-R1 vermittelt die TRAIL-induzierten Effekte

Wie dargestellt, exprimieren Pankreaskarzinom-Zellen sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 auf der Zelloberfläche (vergleiche Abbildung 2). Somit ist davon auszugehen, dass TRAIL an beide Rezeptoren bindet. Somit könnten beide Rezeptoren an den oben beschriebenen TRAIL-induzierten Effekten beteiligt sein. Untersucht wurde nachfolgend, welchen Anteil der jeweilige Rezeptor bei der Vermittlung der TRAIL-induzierten Antwort übernimmt. Als experimentelles Werkzeug für diese Fragestellung standen TRAIL-R-Antagonisten zur Verfügung, die spezifisch TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 blockieren (siehe schematische Darstellung Abbildung 4).

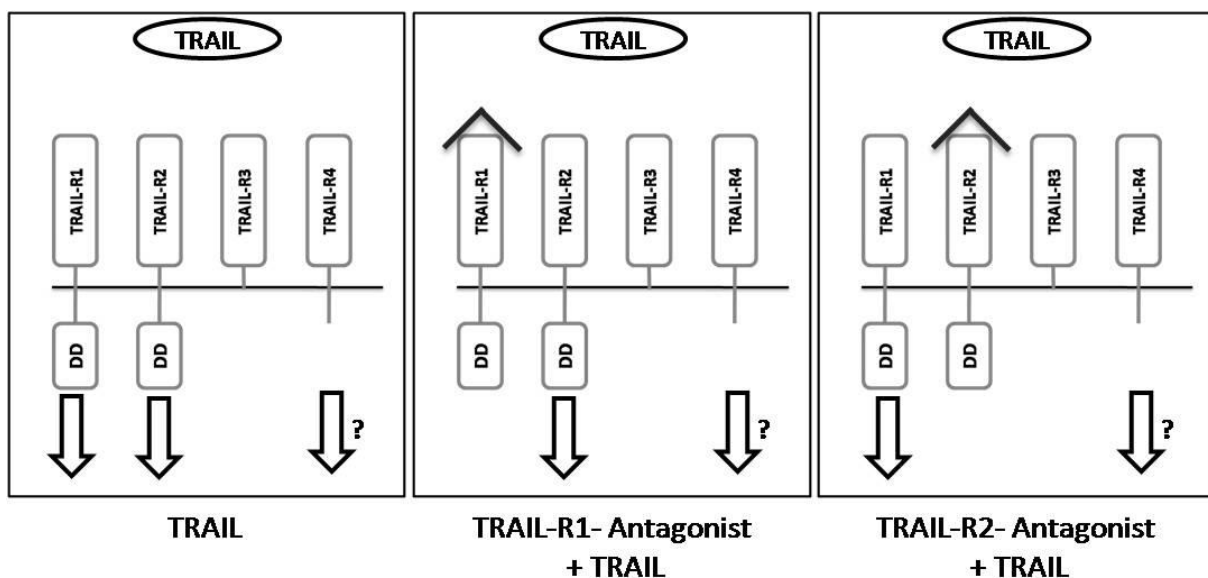


Abbildung 4: Antagonistische Antikörper und TRAIL-Stimulation

TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 wurden selektiv durch antagonistische TRAIL-R-Antikörper-Fragmente blockiert. Gleichzeitig wurden die nicht-blockierten TRAIL-Rezeptoren mit TRAIL stimuliert.

Bei diesen TRAIL-R-Antagonisten handelt es sich um Antikörper-Fragmente, die ausschließlich aus dem Antigen-bindenden Teil (Fab) bestehen. Die Fab-Fragmente wurden im Rahmen der bestehenden Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Wajant (Universität Würzburg) hergestellt und hinsichtlich deren Spezifität getestet (Lemke et al, 2010).

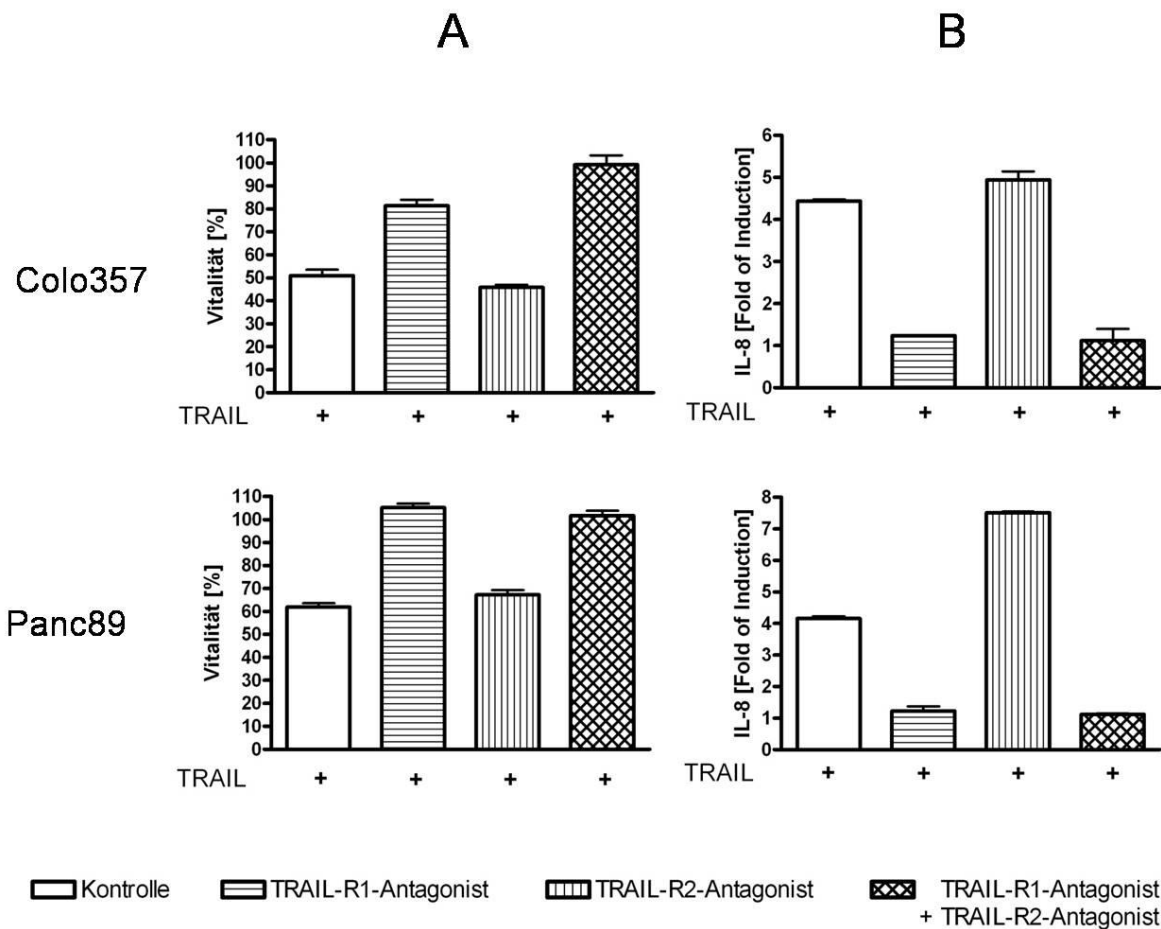


Abbildung 5: Beteiligung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an TRAIL-induzierter Apoptose und pro-inflammatorischer Antwort

Colo357- und Panc89-Zellen wurden mit 100ng/ml TRAIL stimuliert. Eine Stunde vor Stimulation wurden die Zellen mit Kontroll-Medium oder mit antagonistischen Antikörpern (1:10) gegen TRAIL-R1, gegen TRAIL-R2 oder gegen beide Rezeptoren versetzt. Nach 16 Stunden wurde die Vitalität der Zellen mittels Kristallviolett-Assay (5-A) und die IL-8-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA (5-B) bestimmt.

Wie die Abbildung 5-A zeigt, führte die TRAIL-Behandlung der beiden Zelllinien zu Zelltod. Interessanterweise konnte die Zelltod-Induktion nach TRAIL-Stimulation gehemmt werden, wenn TRAIL-R1 mittels antagonistischen Antikörpern blockiert wurde. Nach Blockade von TRAIL-R2 hingegen, wurde der TRAIL-induzierte nicht gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass TRAIL-R1 die TRAIL-induzierte Apoptose in Pankreaskarzinom-Zellen vermittelt. Da bei gleichzeitiger Hemmung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 TRAIL-Stimulation keinerlei Zelltod induzierte, konnte geschlussfolgert

werden, dass die eingesetzten antagonistischen Antikörper beide Todesrezeptoren suffizient und vollständig hemmen und keine agonistische Aktivität besitzen.

Bei der Untersuchung der Beteiligung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an der pro-inflammatorischen, TRAIL-induzierten Antwort zeigte sich, dass auch diese durch TRAIL-R1 vermittelt wird (Abbildung 5-B). So konnte die IL8-Induktion nach TRAIL-Stimulation nahezu vollständig durch den Einsatz von TRAIL-R1-Antagonisten gehemmt werden, nicht jedoch durch den Einsatz von TRAIL-R2-Antagonisten. Hier wurde die IL-8-Induktion sogar verstärkt. Nach gleichzeitiger Blockierung beider Todesrezeptoren konnte die TRAIL-vermittelte IL-8-Induktion vollständig aufgehoben werden.

In der Literatur finden sich zwei Arbeiten, die beschreiben, dass TRAIL-R2, anders als TRAIL-R1, präferentiell durch Membran-gebundenes TRAIL oder hoch-aggregiertes TRAIL aktiviert wird (Muhlenbeck et al, 2000; Wajant et al, 2001). Es galt deshalb auszuschließen, dass die beobachteten Phänomene auf eine Inkompatibilität der von uns verwendeten TRAIL-Präparation (rekombinantes, lösliches TRAIL) mit dem TRAIL-R2 zurückzuführen sind. Dies gelang unter der Verwendung von Jurkat-Zellen, die, wie Abbildung 6-A zeigt, nur TRAIL-R2 (und keinen TRAIL-R1) exprimieren.

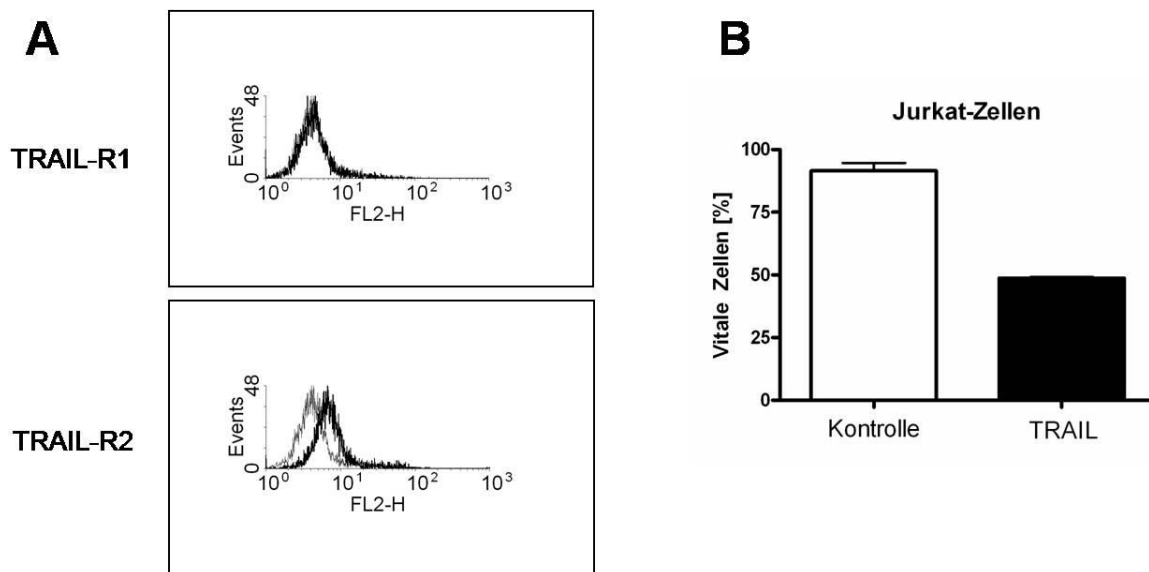


Abbildung 6: Expression von TRAIL-R1 und -R2 auf Jurkat-Zellen und Apoptose-Induktion durch rekombinantes TRAIL in Jurkat-Zellen

A) Analyse der Oberflächen-Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mittels Durchflusszytometrie auf Jurkat-Zellen. Auf der Ordinate sind die Zell-Counts, auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität (FL2-H) aufgetragen. Die dünne Kurve stellt die Isotypkontrolle (IgG1), die stärkere Kurve den jeweiligen TRAIL-Rezeptor-Nachweis dar.

B) Jurkat-Zellen wurden mit 100ng/ml TRAIL behandelt. Nach 16 Stunden wurde die Anzahl der vitalen Zellen mittels Propidium Iodid Anfärbung und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Stimulation dieser Zellen mit dem von uns verwendeten humanen, rekombinanten TRAIL führte zu massivem Zelltod (Abbildung 6-B). Somit konnte eine Inkompatibilität des von uns verwendeten TRAIL mit TRAIL-R2 als Grund für die Inaktivität des TRAIL-R2 nach TRAIL-Stimulation ausgeschlossen werden.

3.4 Agonistische TRAIL-R-Antikörper induzieren Zelltod und IL-8

In der Klinik finden neben TRAIL auch agonistische TRAIL-Rezeptor-Antikörper Anwendung, die selektiv einen der beiden Todesrezeptoren aktivieren. Zwei dieser Antikörper, HGS-ETR1 und HGS-ETR2, wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt und deren Wirkung evaluiert. Mit diesen Antikörpern stand ein weiteres experimentelles Werkzeug zur Verfügung, um unterschiedliche apoptotische und nicht-apoptotische Funktionen von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu analysieren, da hier jeweils nur ein Rezeptor aktiviert wird (siehe schematische Darstellung Abbildung 7).

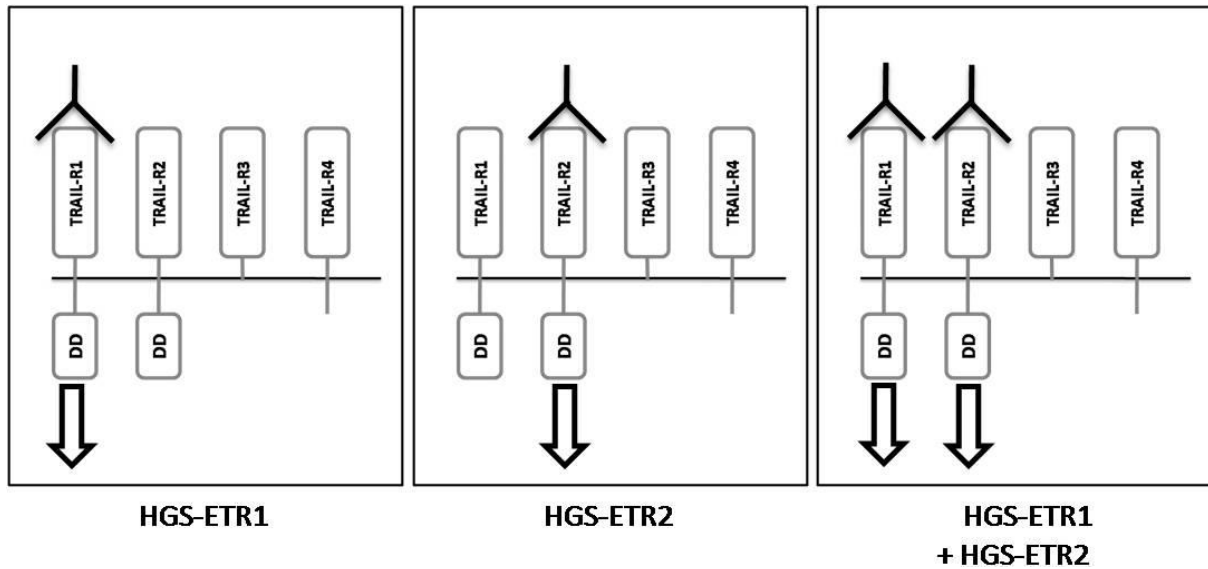


Abbildung 7: Agonistische TRAIL-Rezeptor-Antikörper

Der agonistische TRAIL-R-Antikörper HGS-ETR1 (Mapatumumab) aktiviert selektiv TRAIL-R1; HGS-ETR2 (Lexatumumab) aktiviert selektiv TRAIL-R2.

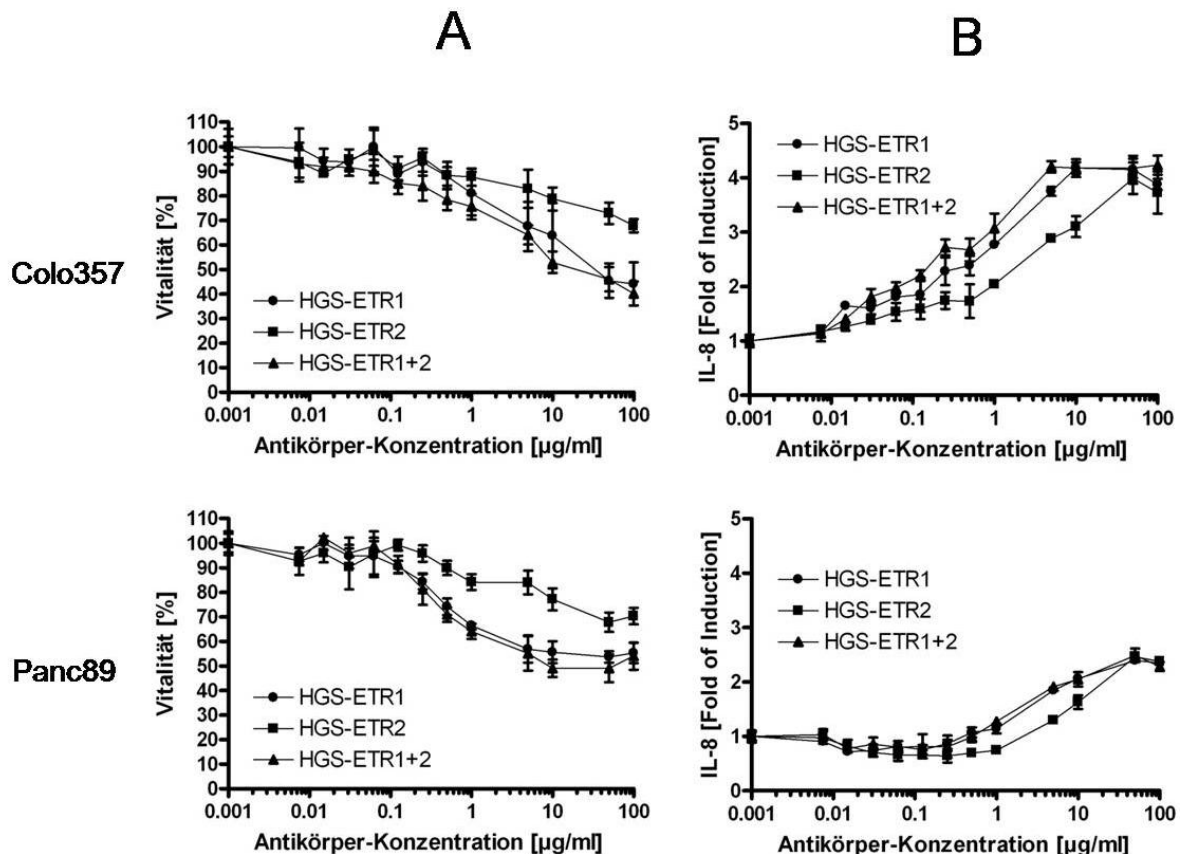


Abbildung 8: Apoptotischen und pro-inflammatorischen Wirkung der agonistischen TRAIL-Rezeptor-Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2

Colo357- und Panc89-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der agonistischen Antikörper HGS-ETR1, HGS-ETR2 oder beiden behandelt. Nach 16 Stunden wurden die Vitalität (8-A) mittels Kristallviolett-Assay und die IL-8-Konzentration (8-B) im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt.

Die in Abbildung 8 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation des TRAIL-R1 durch HGS-ETR1 dosisabhängig zu Zelltod und zu einer IL-8-Induktion in den beiden untersuchten Zelllinien führte. Auch die selektive Aktivierung des TRAIL-R2 durch HGS-ETR2 induzierte potent Zelltod und IL-8. In beiden Zelllinien induzierte HGS-ETR1 bei äquivalenter Antikörperkonzentration potenter Apoptose und IL-8 als HGS-ETR2. Weiter führte in diesen Zellen, interessanterweise, die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit HGS-ETR1 und HGS-ETR2 zu keinem additiven Effekt, weder bei der Bestimmung des Zelltodes noch bei der Bestimmung der IL-8-Sekretion. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse überrascht die Beobachtung, dass die Aktivierung von TRAIL-R2 durch HGS-ETR2 potent möglich ist, da der natürliche Ligand TRAIL Apoptose und IL-8 nahezu ausschließlich über TRAIL-R1 induziert.

3.5 Differentielle NF- κ B-Induktion durch TRAIL und TRAIL-R-Agonisten

Offensichtlich besteht hinsichtlich der Beteiligung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an apoptotischer und pro-inflammatorischer Antwort ein wesentlicher Unterschied darin, ob mit dem natürlichen Liganden TRAIL oder mit agonistischen TRAIL-R-Antikörpern stimuliert wird. So induzierte der agonistische TRAIL-R-Antikörper HGS-ETR2 in beiden untersuchten Zelllinien IL-8, wohingegen der TRAIL-R2 nach TRAIL-Stimulation nahezu keine pro-inflammatorische Antwort induzierte. Als „Read-Out“-System für die analysierte pro-inflammatorische Antwort wurde die IL-8-Induktion bestimmt. Um dieses Ergebnis näher zu charakterisieren, wurde die Aktivierung des vorgeschalteten Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65/p50 und p50/p50) durch TRAIL oder agonistische TRAIL-R-Antikörper in Panc89-Zellen untersucht.

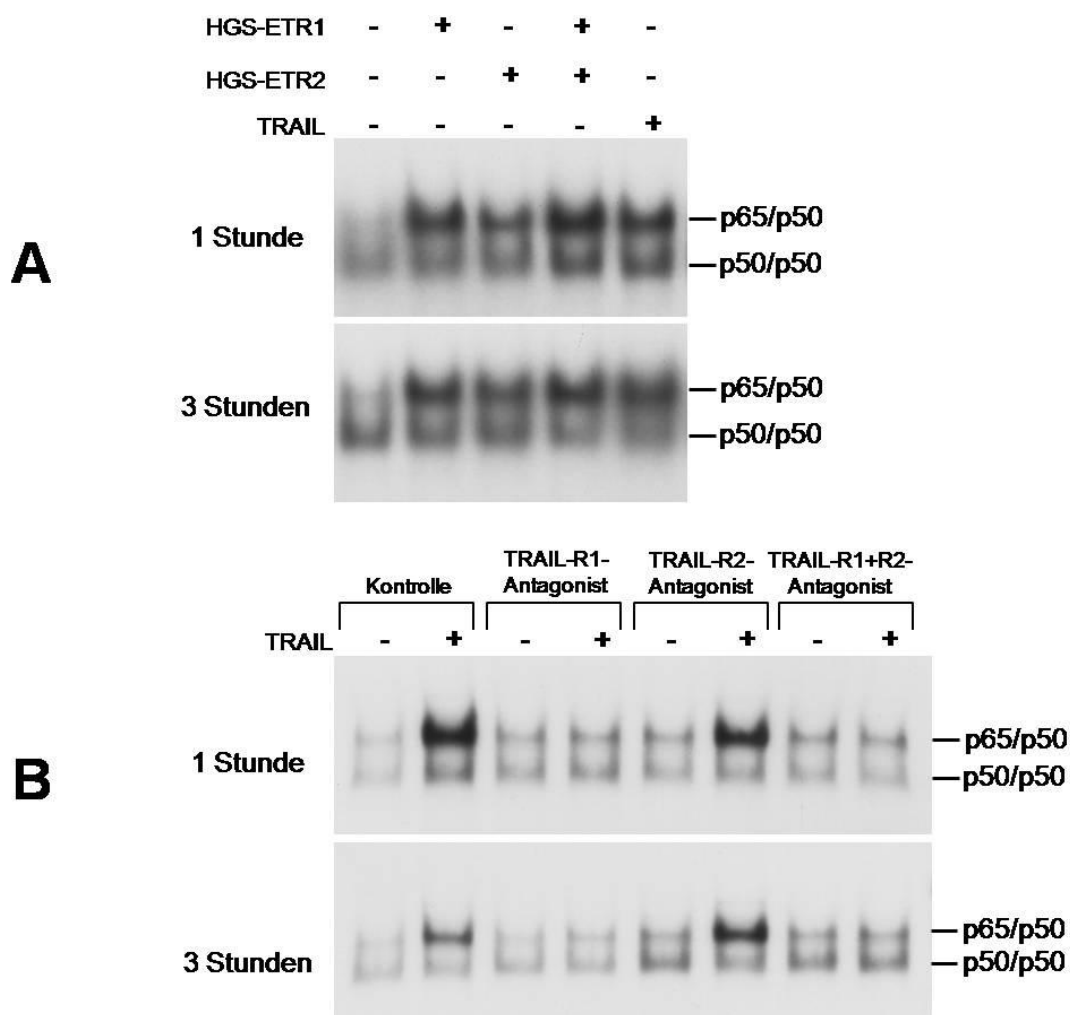


Abbildung 9: NF- κ B-Induktion durch TRAIL und agonistische TRAIL-Rezeptor-Antikörper

A) Panc89-Zellen wurden mit HGS-ETR1 (10 μ g/ml), HGS-ETR2 (10 μ g/ml), HGS-ETR1 + HGS-ETR2 (jeweils 10 μ g/ml) oder TRAIL (100ng/ml) für die angegebene Dauer stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und die NF- κ B-Aktivierung (p65/p50 und p50/p50) im EMSA analysiert.

B) Panc89-Zellen wurden zunächst mit antagonistischen-TRAIL-Rezeptor Antikörpern gegen TRAIL-R1 oder TRAIL-2 vorinkubiert und anschließend für die angegebene Dauer mit 100ng/ml TRAIL stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und die NF- κ B-Aktivierung (p65/p50 und p50/p50) im EMSA analysiert.

Wie Abbildung 9-A zeigt, führte sowohl die Stimulation mit HGS-ETR1 als auch die Stimulation mit HGS-ETR2 zu einer starken NF- κ B-Induktion. Vergleichend war die NF- κ B-Antwort nach HGS-ETR1-Stimulation bei äquivalenter Antikörperkonzentration ausgeprägter. Die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit beiden Antikörpern führte zu keinem additiven Effekt.

Im Vergleich dazu führte, wie in Abbildung 9-B dargestellt, auch TRAIL-Stimulation zu einer deutlichen NF- κ B-Aktivierung. Wurde TRAIL-R1 blockiert, konnte diese Antwort jedoch vollständig aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu konnte die Blockierung des TRAIL-R2 die TRAIL-induzierte NF- κ B-Aktivierung nicht hemmen. Wie Abbildung 9-B zeigt, kam es hier nach 3 Stunden TRAIL-Behandlung sogar zu einer Verstärkung der NF- κ B-Aktivierung. Nach Blockade von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 konnte die TRAIL-induzierte NF- κ B-Aktivierung vollständig aufgehoben werden.

3.6 TRAIL-Rezeptorkomplex-Analyse

Ziel der nachfolgenden Experimente war es, Unterschiede zwischen der Rezeptorkomplex-Zusammensetzung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 insbesondere hinsichtlich der Stimulationsart (TRAIL oder TRAIL-R-Agonisten) zu identifizieren. Ziel war es, Hinweise für die Ursache der beschriebenen funktionellen Unterschiede zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden mittels Immunpräzipitation TRAIL-Rezeptorkomplexe nach Stimulation mit TRAIL oder TRAIL-R-Agonisten analysiert.

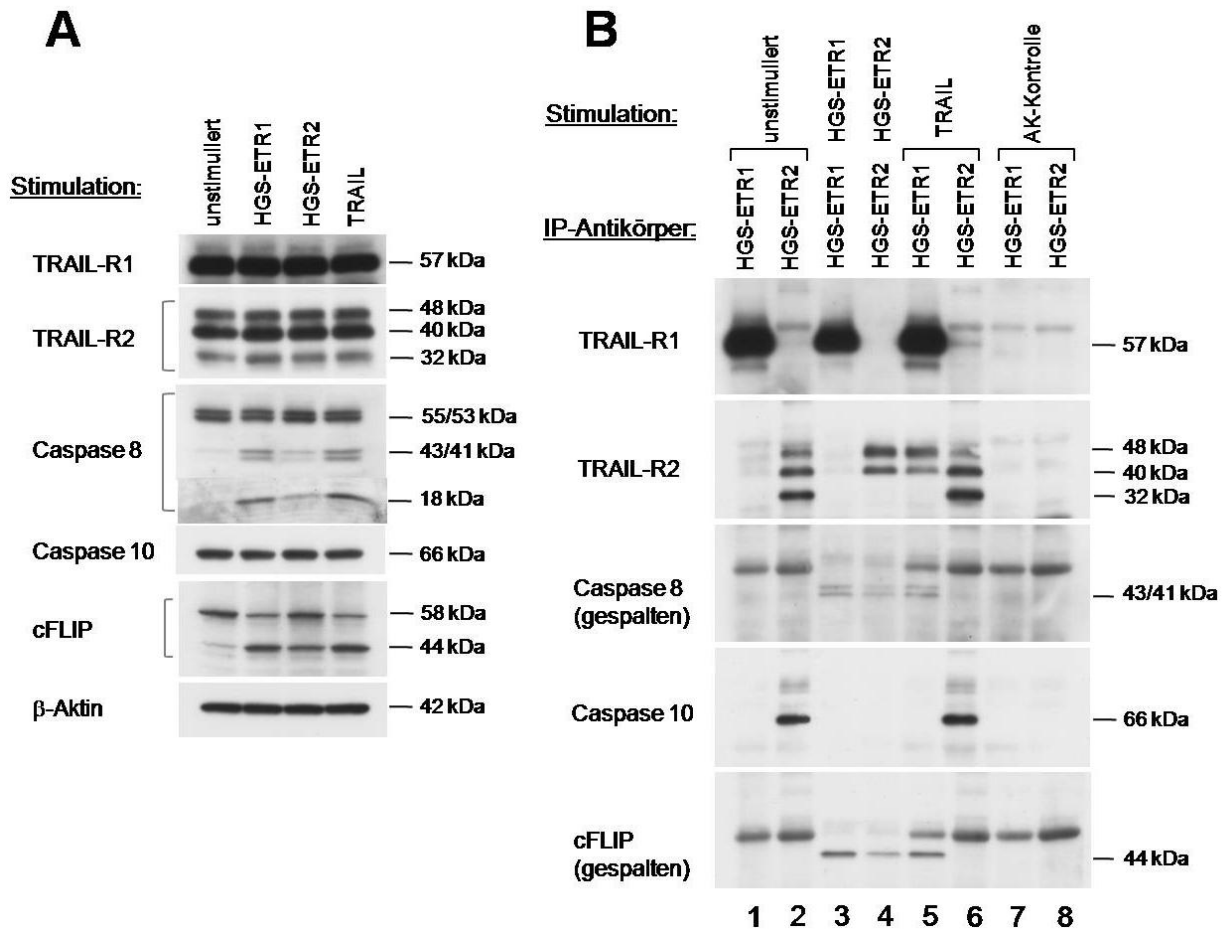


Abbildung 10: TRAIL-Rezeptor-Komplex-Analyse nach Immunpräzipitation mit HGS-ETR1 und HGS-ETR2

A und B) Panc89-Zellen wurde für eine Stunde mit HGS-ETR1, HGS-ETR2 (je 10 μ g/ml) oder TRAIL (100ng/ml) behandelt und anschließend lysiert (siehe Material und Methoden).

A) Aus den erstellten Lysaten wurden mittels Western-Blot-Technik die Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2, Caspase-8, Caspase-10 und cFLIP analysiert. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von β -Aktin bestimmt.

B) TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurden mit den Antikörpern HGS-ETR1 und HGS-ETR2 aus den erstellten Lysaten präzipitiert (siehe Material und Methoden). Für die Präzipitation der Rezeptoren nach agonistischer Antikörper-Stimulation (Spalte 3 und 4) wurde der Stimulation-Antikörper genutzt und kein Präzipitationsantikörper hinzugefügt. Die Immunpräzipitate wurden mittels Western-Blot-Technik auf die Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2, Caspase-8, Caspase-10 und cFLIP hin untersucht. Für den Nachweis der unspezifischen Bande der schweren und leichten Kette der Präzipitations-Antikörper wurden Antikörperkontrollen (AK-Kontrolle) mitgeführt.

3.6.1 TRAIL-Stimulation führt zu heterogenen Komplexen aus TRAIL-R1 und TRAIL-R2, selektive Aktivierung der Rezeptoren mit TRAIL-R-Agonisten führt zu homogenen Komplexen

Wie die Abbildung 10-A zeigt, konnten in den vor der Immunopräzipitation gewonnenen Gesamtzelllysaten aus nicht-stimulierten, HGS-ETR1-, HGS-ETR2- und TRAIL-stimulierten Zellen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 ohne quantitative Unterschiede nachgewiesen werden. Der Nachweis von TRAIL-R1 und -R2 nach Immunpräzipitation der Rezeptor-Komplexe (Abbildung 10-B) zeigte, dass bereits in nicht-stimulierten Zellen Heterokomplexe aus TRAIL-R1 und -R2 vorlagen (Spalte 1 und 2). Nach Stimulation mit dem natürlichen Liganden TRAIL waren ebenfalls Heterokomplexe nachweisbar (Spalte 5 und 6). Hingegen fanden sich im DISC nach selektiver Stimulation mit HGS-ETR1 oder HGS-ETR2 homogene Komplexe bestehend aus ausschließlich TRAIL-R1 nach HGS-ETR1-Stimulation bzw. aus ausschließlich TRAIL-R2 nach HGS-ETR2-Stimulation (Spalte 3 und 4).

In nicht-stimulierten und TRAIL-stimulierten TRAIL-R2-Komplexen konnte beim Nachweis des TRAIL-R2 eine zusätzliche Bande (~32 kDa) nachgewiesen werden (Abbildung 10-B, Spalte 2 und 6). Diese konnte bereits bei der Untersuchung der Rezeptor-Expression als kleine Form des TRAIL-R2 identifiziert werden (vergleiche Abbildung 1). Interessanterweise konnte diese TRAIL-R2-Form nicht im DISC nach HGS-ETR2-Stimulation nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 10-B, Spalte 4).

3.6.2 Stimulation mit TRAIL-R-Agonisten führt zu Caspase-8- und cFLIP-Spaltung an TRAIL-R1 und TRAIL-R2, Stimulation mit TRAIL führt zu Caspase-8- und cFLIP-Spaltung ausschließlich an TRAIL-R1

Der Nachweis von Caspase-8 und cFLIP in den Gesamtzelllysaten vor der Immunopräzipitation zeigt, dass die Stimulation sowohl mit HGS-ETR1 als auch mit HGS-ETR2 zur Spaltung von Caspase-8 und cFLIP führt (Abbildung 10-A). Passend zu den bisherigen Ergebnissen der Bestimmung von Zelltod und IL-8-Sekretion führte HGS-ETR1-Stimulation zu einer stärkeren Caspase-8- und cFLIP-Spaltung als HGS-ETR2. TRAIL-Behandlung führt ebenso zur Spaltung von Caspase-8 und cFLIP (Abbildung 10-A).

Die Analyse der Rezeptor-Komplexe (Abbildung 10-B) zeigte, dass die HGS-ETR1-Stimulation zur Caspase-8- und cFLIP-Spaltung an TRAIL-R1 und die HGS-ETR2-

Stimulation zu Caspase-8- und cFLIP -Spaltung an TRAIL-R2 führt (Spalte 3 und 4). Hingegen war Caspase-8- und cFLIP-Spaltung nach TRAIL-Stimulation nur an TRAIL-R1, nicht aber an TRAIL-R2 nachweisbar (vergleiche Spalte 5 und 6).

3.6.3 Nicht-stimulierte Zellen rekrutieren Caspase-10 an TRAIL-R2

Weiter konnte in nicht-stimulierten Zellen konstitutiv Caspase-10 nachgewiesen werden - interessanterweise ausschließlich an TRAIL-R2 (Abbildung 10-B, Spalte 2). Im TRAIL-R2-DISC (nach Apoptose-auslösender HGS-ETR2-Stimulation) dagegen war Caspase-10 nicht nachweisbar (Spalte 4).

3.7 Bedeutung der PKC und MEK für TRAIL-induzierte Apoptose

Neben NF- κ B aktiviert TRAIL in Pankreaskarzinom-Zellen auch weitere nicht-apoptotische Signalwege, unter anderem PKC und MAP-Kinasen (siehe Einleitung). Mit GÖ6983 und UO126 stehen zwei Inhibitoren dieser Signalwege zur Verfügung. GÖ6983 inhibiert direkt die PKC. Der MEK-Inhibitor inhibiert die MEK, welche in einer Signalkaskade durch Phosphorylierung die MAPK aktiviert. Untersucht wurde die Beteiligung beider Signalwege an der TRAIL-induzierten Apoptose durch TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Der Einfluss der Inhibitoren auf TRAIL-induzierte IL-8-Sekretion konnte nicht bestimmt werden, da sowohl GÖ6983 als auch UO126 bereits die basale IL-8-Sekretion dramatisch hemmen und keine Induktion quantifiziert werden konnte.

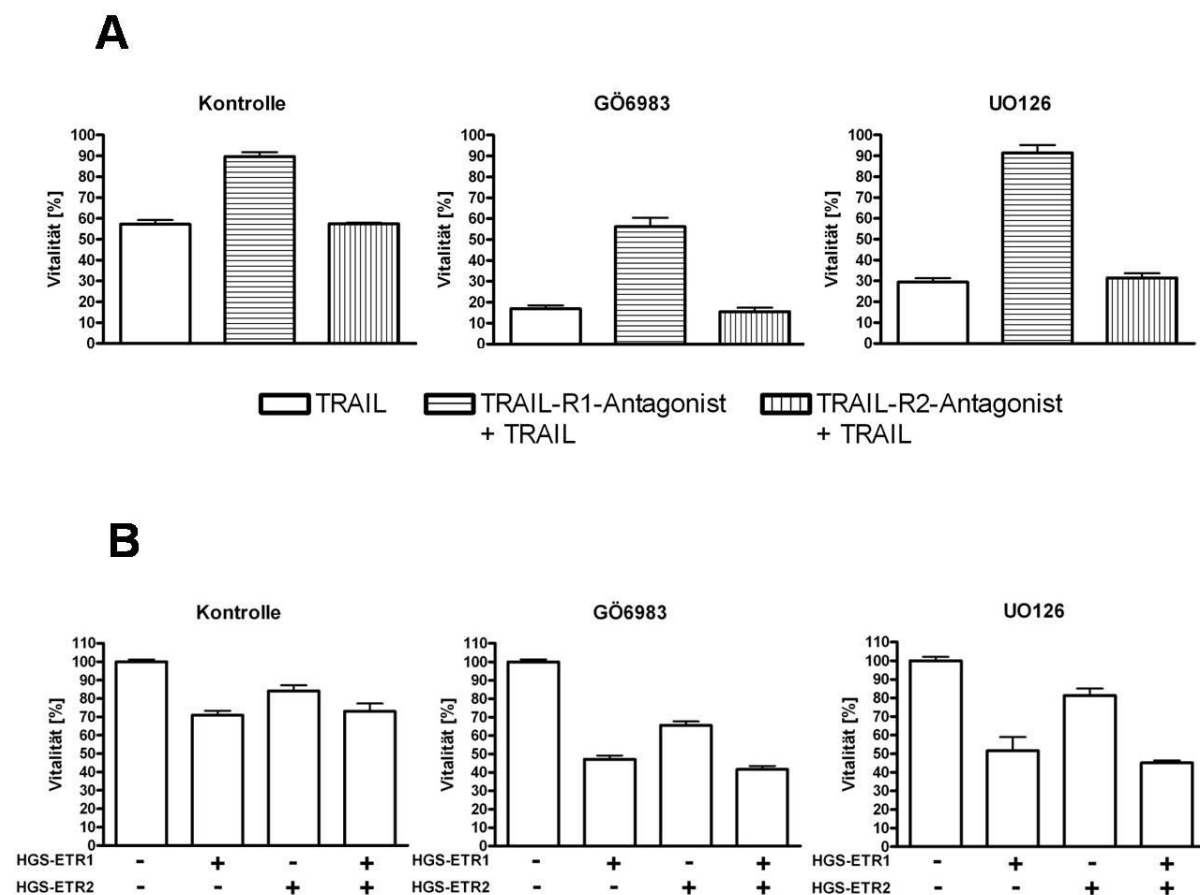


Abbildung 11: Bedeutung der PKC- und MAPK-Signalwege auf die TRAIL-induzierte Apoptose durch TRAIL-R1 und TRAIL-R2

A) Panc89-Zellen wurden mit antagonistischen TRAIL-R1- bzw. -R2-Antikörpern (1:10) versetzt und für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurde der Inhibitor GÖ6983 (20 μ M) bzw. UO126 (10 μ M) hinzugefügt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit TRAIL (100ng/ml) stimuliert. Zellvitalität wurde nach 16 Stunden mittels Kristallviolett-Assay bestimmt.

B) Panc89-Zellen wurden mit GÖ6983 (20 μ M) bzw. MEK-Inhibitor (10 μ M) inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit HGS-ETR1 (10 μ g/ml), HGS-ETR2 (10 μ g/ml) oder HGS-ETR1+2 (je 10 μ g/ml) stimuliert. Zellvitalität wurde nach 16 Stunden mittels Kristallviolett-Assay bestimmt.

3.7.1 GÖ6983 sensibilisiert für TRAIL-induzierte Apoptose über beide Rezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2

Die Inhibition der PKC mittels GÖ6983 führte zu einer dramatischen Sensibilisierung der TRAIL-induzierten Apoptose. Wie die Abbildung 11-A zeigt, wurde diese Sensibilisierung durch beide Rezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) vermittelt. Zum einen wurde der TRAIL-vermittelte Zelltod über TRAIL-R1 (in Gegenwart von

antagonistischen TRAIL-R2-Antikörpern) durch die Hemmung der PKC verstärkt. Erstaunlicherweise führte aber auch TRAIL-Stimulation in Gegenwart von antagonistischen TRAIL-R1-Antikörpern zu Zelltod, wenn die PKC gehemmt wurde. Ohne PKC-Inhibition war der TRAIL-induzierte Zelltod über TRAIL-R2 nahezu aufgehoben und wurde über TRAIL-R1 vermittelt.

Wie die Abbildung 11-B zeigt, führte der Einsatz von GÖ6983 auch zu einer Sensibilisierung der Apoptose, die durch agonistische TRAIL-R-Antikörper induziert wird. Die Zelltod-Induktion durch HGS-ETR1, durch HGS-ETR2 und durch die Kombination beider Antikörper wurde durch die Hemmung der PKC verstärkt.

3.7.2 UO126 sensibilisiert für TRAIL-induzierte Apoptose nur über TRAIL-R1

Wie die Abbildung 11-A weiter zeigt, führte auch die Inhibition der MEK mittels UO126 zu einer Sensibilisierung der TRAIL-induzierten Apoptose. Diese wurde jedoch ausschließlich von TRAIL-R1 vermittelt. Der Einsatz von UO126 führte (anders als der Einsatz von GÖ6983) nicht dazu, dass in Gegenwart von antagonistischen TRAIL-R1-Antikörpern der TRAIL-R2 verstärkt Zelltod vermittelt. Hingegen ist in Gegenwart von antagonistischen TRAIL-R2-Antikörpern eine Sensibilisierung der TRAIL-vermittelten Apoptose über TRAIL-R1 zu beobachten.

Dazu passende Ergebnisse zeigte die Stimulation mit agonistischen TRAIL-R-Antikörpern unter Verwendung von UO126 (Abbildung 11-B). Wurde der MEK-Inhibitor UO126 eingesetzt, konnte die durch HGS-ETR1 induzierte Apoptose verstärkt werden, nicht jedoch die durch HGS-ETR2. Erwartungsgemäß wurde auch die durch die Kombination beider Antikörper induzierte Apoptose durch UO126 verstärkt.

3.8 Zelluläre Lokalisation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in ihrer Expression hinsichtlich der zellulären Lokalisation unterscheiden.

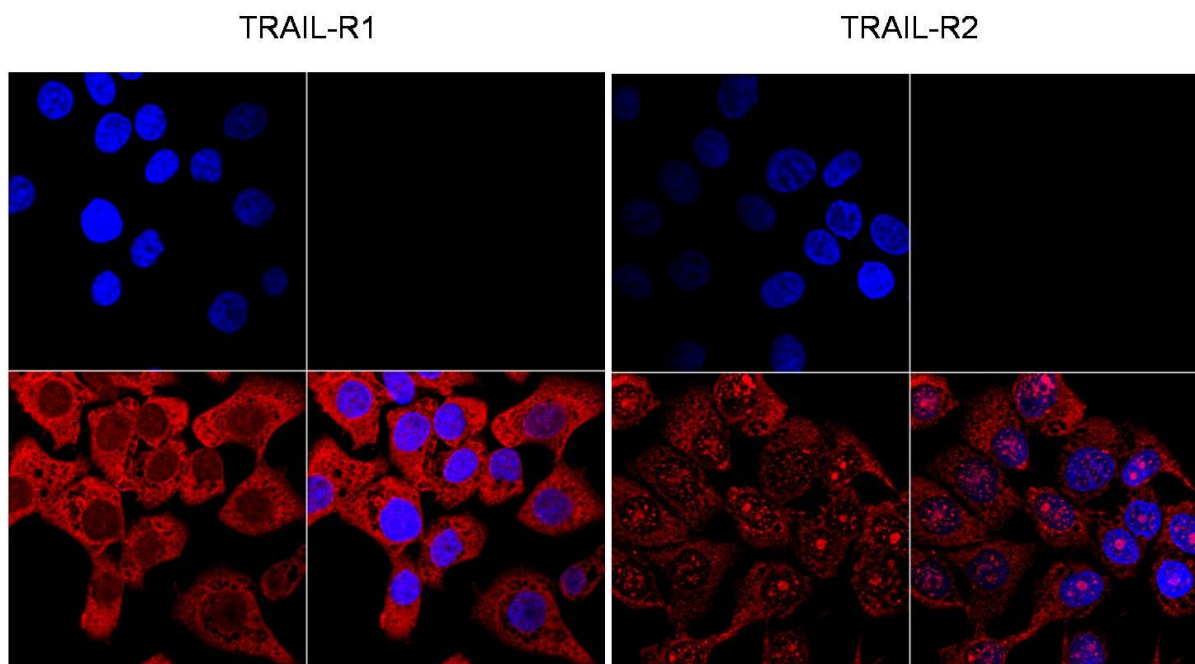


Abbildung 12: Zelluläre Lokalisation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2

Panc89-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 Stunden später wurde die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Im konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie-Bild ist in Blau (350nm) der Zellkern (Hoechst-Farbstoff) und in Rot (546nm) TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 dargestellt.

Die durchgeführte immunhistochemische Analyse (Abbildung 12) zeigte, dass beide Rezeptoren im Zytoplasma und auf der Zellmembran exprimiert werden. Erstaunlicherweise konnte jedoch nachgewiesen werden, dass TRAIL-R2 (im Gegensatz zu TRAIL-R1) zusätzlich massiv im Zellkern vertreten ist. Um zu verifizieren, dass TRAIL-R2 tatsächlich im Zellkern exprimiert wird, wurde die TRAIL-R2-Expression jeweils im Zytosol- und Kernextrakt bestimmt. Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, zeigte sich, dass im Zellkern insbesondere die bereits identifizierte kleine TRAIL-R2-Form exprimiert wird.

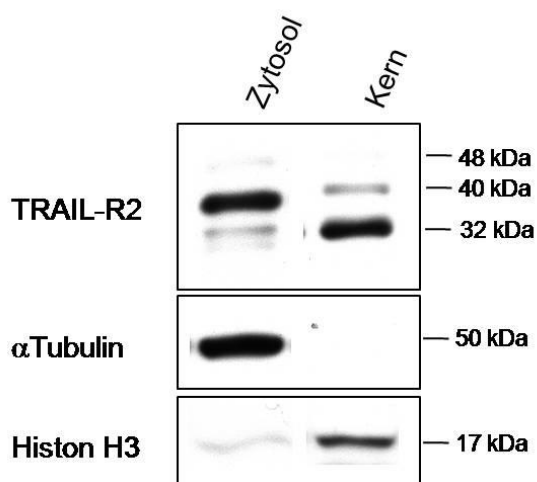


Abbildung 13: Zelluläre Lokalisation von TRAIL-R2

Aus Panc89-Zellen wurden Kern- und Zytosol-Lysate (EMSA-Lysate) hergestellt. Mittels Western-Blot-Technik wurde in beiden Lysaten die Expression von TRAIL-R2 analysiert. Parallel wurden die Expression von α Tubulin als Kennprotein für die Zytosolfraktion und die Expression von Histone H3 als Kennprotein für die Kernfraktion bestimmt.

3.9 Identifizierung von TRAIL-Rezeptor assoziierten Proteinen

Die bisher durchgeführten Immunpräzipitations-Experimente zeigten bereits deutliche Unterschiede zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2, unter anderem die Assoziation von TRAIL-R2 und Caspase-10. Dies gab Anlass zu untersuchen, ob noch weitere Rezeptor-Komplex assoziierten Proteine identifiziert werden können. Hierzu wurden nach Immunpräzipitation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2, in Kooperation mit Prof. Dr. O. Janßen (Institut für Immunologie, Kiel) die Rezeptor-Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt, Proteine isoliert und mittels MALDI-Massenspektrometrie sequenziert. Die Analyse (Abbildung 14) zeigte, dass in Assoziation mit TRAIL-R2 zahlreiche Kernproteine identifiziert werden konnten, die am Splicing und an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Keines dieser Proteine konnte in Assoziation mit TRAIL-R1 identifiziert werden.

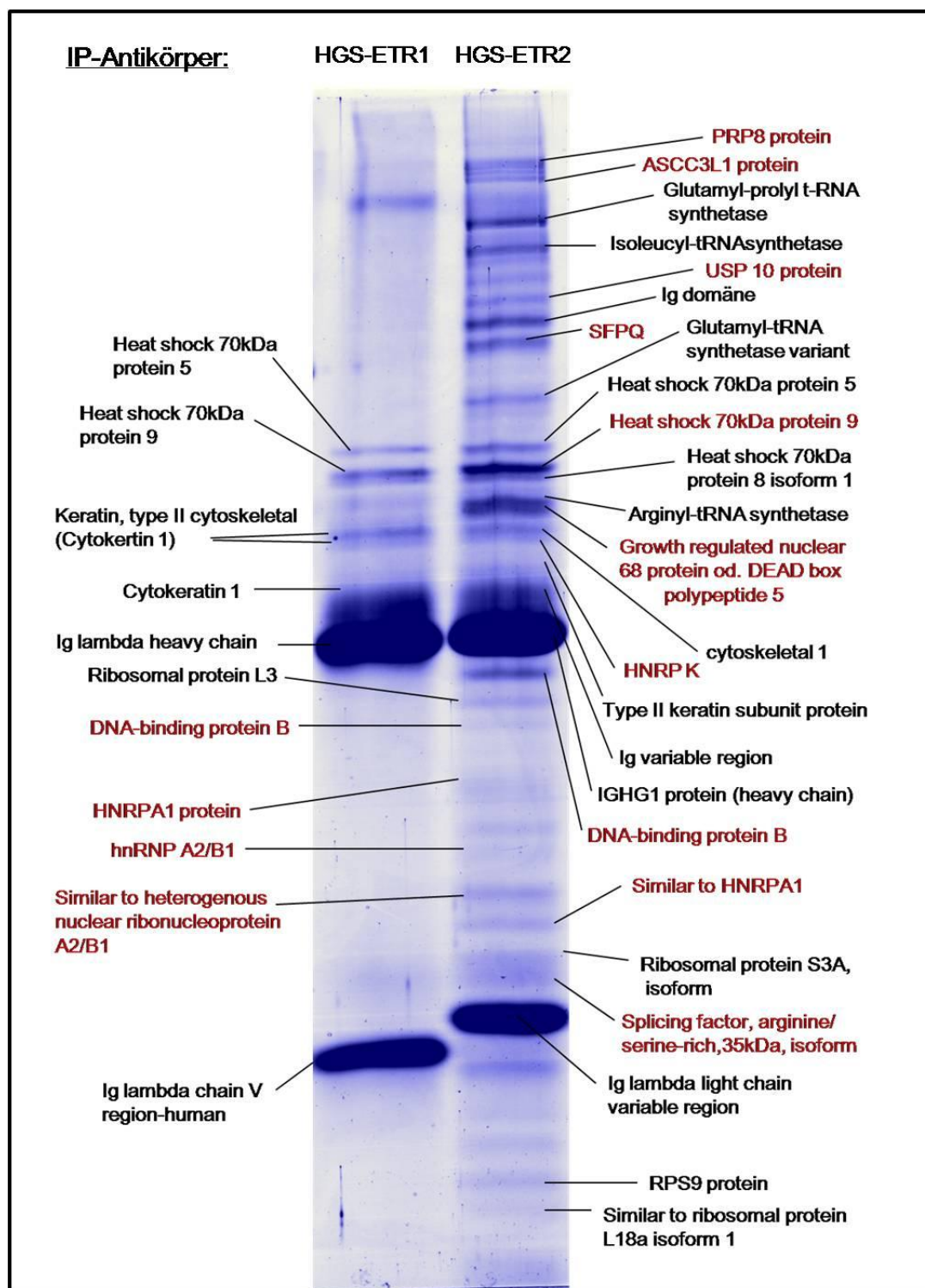


Abbildung 14: Identifizierung von TRAIL-Rezeptor-assoziierten Proteinen

Nicht-stimulierte TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-Rezeptor-Komplexe wurden aus Panc89-Zellen mittels TRAIL-Rezeptor-Antikörpern HGS-ETR1 und HGS-ETR2 präzipitiert. Die Proben wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel mit Comassie gefärbt. Einzelne Banden wurden isoliert und mittels MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. In der dargestellten Auswertung sind Proteine, die am Splicing oder der Genregulation beteiligt sind, rot gefärbt.

4. Diskussion

Der Todesligand TRAIL ist in der Lage, nach Bindung an zwei Todesrezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2), Apoptose selektiv in Tumorzellen auszulösen (Ashkenazi et al, 1999; Walczak et al, 1999). Diese Eigenschaft macht den Einsatz von TRAIL zu einer potentiellen Therapieoption für Malignome, insbesondere auch für die Behandlung des Pankreaskarzinoms, welches weitgehend Therapie-resistent gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie ist (Bardeesy & DePinho, 2002). Jedoch konnte inzwischen gezeigt werden, dass TRAIL neben Apoptose auch nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Signalwege aktiviert, die zu Invasion und Metastasierung führen (Siegmond et al, 2007; Trauzold et al, 2006; Trauzold et al, 2001). Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass für den möglichen therapeutischen Einsatz von TRAIL oder agonistischen TRAIL-R-Antikörpern zunächst ein genaues Verständnis der TRAIL-induzierten Effekte und Signalwege von Nöten ist. Genau verstanden werden muss insbesondere, welche Rolle die beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und -R2 spielen. Hierzu wurden in vorliegender Arbeit die spezifischen Funktionen beider Rezeptoren in Pankreaskarzinom-Zellen untersucht.

Zunächst wurde die TRAIL-Rezeptor-Expression von Pankreaskarzinom-Zellen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelllinien sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Behandlung von Pankreaskarzinom-Zellen mit TRAIL zeigte, dass TRAIL sowohl Zelltod als auch eine nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Antwort (IL-8) induziert. Um mögliche unterschiedliche Funktionen von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu identifizieren, war es erforderlich, jeweils einen Rezeptor selektiv zu aktivieren und die induzierte apoptotische und nicht-apoptotische Antwort des jeweiligen Rezeptors mit der des zweiten Rezeptors zu vergleichen. Hierzu standen als experimentelles Werkzeug antagonistische TRAIL-R-Antikörper zur Verfügung. Überraschenderweise zeigte die TRAIL-Stimulation der untersuchten Zellen, nachdem jeweils TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 mittels Antagonist blockiert wurde, dass die TRAIL-induzierte apoptotische und pro-inflammatorische Antwort in Pankreaskarzinom-Zellen nahezu ausschließlich durch TRAIL-R1 vermittelt wurde. Dass der Grund hierfür nicht eine Inkompatibilität des eingesetzten TRAIL mit dem TRAIL-R2 war, zeigte die Stimulation von Jurkat-Zellen. Obwohl dieser Zelltyp nur TRAIL-R2, nicht aber TRAIL-R1 exprimiert,

induzierte das von uns verwendete TRAIL massiven Zelltod. Als weiteres experimentelles Werkzeug standen agonistische TRAIL-R-Antikörper zur Verfügung, die bereits klinisch in der Therapie von Malignomen Anwendung finden. Die selektive Aktivierung von TRAIL-R1 (mit HGS-ETR1) oder TRAIL-R2 (mit HGS-ETR2) zeigte, dass beide Rezeptoren potent funktionsfähig sind, da sowohl HGS-ETR1- als auch HGS-ETR2-Stimulation zu massiver Apoptose- und IL-8-Induktion führte. Analoge Ergebnisse zeigte auch die Analyse der NF- κ B-Aktivierung. Beide Rezeptoren aktivieren NF- κ B, wenn diese durch agonistische TRAIL-Rezeptor-Antikörper selektiv stimuliert werden. Hingegen wird die TRAIL-induzierte NF- κ B-Aktivierung ausschließlich durch TRAIL-R1 vermittelt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Pankreaskarzinom-Zellen funktionsfähigen TRAIL-R1 und TRAIL-2 exprimieren. Jedoch wird die vom natürlichen Liganden induzierte Antwort fast ausschließlich über TRAIL-R1 vermittelt. Offensichtlich besteht ein entscheidender Unterschied, ob mit dem natürlichen Liganden TRAIL stimuliert wird oder die Rezeptoren mittels agonistischer Antikörper aktiviert werden.

Welches der entscheidende Rezeptor für TRAIL-induzierte Effekte ist, wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits für einige Tumorzelllinien untersucht. Interessanterweise zeigten *Kelley et al.*, dass TRAIL-R2 den TRAIL-induzierten Zelltod in Kolonkarzinom- und Mammakarzinom-Zellen vermittelt. Die Arbeit zeigte unter Verwendung von TRAIL-R-selektivem TRAIL, dass TRAIL in diesen Zellen Apoptose fast ausschließlich über TRAIL-R2 induziert (*Kelley et al*, 2005). Gestützt wurde diese These durch die Tatsache, dass TRAIL-R2 bei physiologischen Temperaturen eine höhere Affinität zu TRAIL ausweist als TRAIL-R1 (*Truneh et al*, 2000). Interessanterweise zeigte noch im selben Jahr eine andere Arbeit, dass diese Annahme nicht für alle Tumorzelllinien zutrifft. *MacFarlane et al.* publizierten, dass TRAIL-R1 in CLL-Zellen (Chronisch Lymphatische Leukämie) der übergeordnete Rezeptor für TRAIL-vermittelte Apoptose ist (*MacFarlane et al*, 2005). Die zitierte Arbeitsgruppe verwendete die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten agonistischen TRAIL-R-Antikörper HGS-ETR1 und HGS-ETR2 und schlussfolgerte aus der Tatsache, dass vor allem die Aktivierung von TRAIL-R1 mittels HGS-ETR1 Zelltod induziert, dass TRAIL-R1 der entscheidende Rezeptor in CLL-Zellen ist. Vor dem Hintergrund, dass in der vorliegenden Arbeit jedoch markante Unterschiede

zwischen der Stimulierung mit agonistischen TRAIL-Rezeptor-Antikörpern und mit TRAIL aufgezeigt werden konnten, ist eine Aussage über die generelle Aktivität eines Rezeptors kritisch zu bewerten. Eine differenzierte Untersuchung der induzierten Effekte durch TRAIL im Vergleich zu agonistischen TRAIL-R-Antikörpern ist augenscheinlich unabdingbar.

Als nächster Schritt sollte in der vorliegenden Arbeit die Analyse der TRAIL-Rezeptor-Komplexe mittels Immunpräzipitation Aufschluss darüber geben, wie die unterschiedlichen Effekte von TRAIL und agonistischen TRAIL-R-Antikörpern zu erklären sind. Hierzu wurden jeweils TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 aus vier verschiedenen Experimenten präzipitiert: aus nicht-stimulierten Zellen, aus HGS-ETR1- bzw. HGS-ETR2-stimulierten Zellen und aus TRAIL-stimulierten Zellen. Anschließend wurden TRAIL-R1, TRAIL-R2 und Rezeptor-Komplex-assoziierte Proteine mittels Western-Blot-Technik nachgewiesen. Die Ergebnisse bestätigten zunächst die bisher beobachteten Phänomene: So konnten Caspase-8- und cFLIP-Spaltung nach TRAIL-Stimulation nur an TRAIL-R1, nach Stimulation mit agonistischen TRAIL-R-Antikörpern an beiden Rezeptoren nachgewiesen werden. Caspase-8 und cFLIP werden nach Aktivierung über das Adapterprotein FADD an die Todesdomäne der TRAIL-Rezeptoren rekrutiert und in Folge der Aktivierung gespalten. Die Spaltung der beiden Proteine ist somit Ausdruck der Rezeptor-Aktivierung. Interessanterweise deckte die Immunpräzipitation aber noch weitere Unterschiede zwischen der Stimulation mit TRAIL und mit agonistischen Antikörpern auf. So zeigte sich, dass TRAIL-Behandlung der Zellen zur Bildung von Heterokomplexen aus TRAIL-R1 und TRAIL-R2 führte. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit HGS-ETR1 zu homogenen Komplexen bestehend aus TRAIL-R1 und die Stimulation mit HGS-ETR2 zu homogenen Komplexen bestehend aus TRAIL-R2. Dass eine unterschiedliche Rezeptor-Komplex-Zusammensetzung funktionelle Konsequenzen mit sich bringt, ist bisher unbekannt. In der Literatur ist lediglich beschrieben, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 heterogene Komplexe bilden können (Kischkel et al, 2000). Möglicherweise könnten die nachgewiesenen, von der Stimulationsart abhängigen, unterschiedlichen Rezeptor-Komplex-Zusammensetzungen ursächlich für die beobachteten funktionellen Unterschiede sein.

Weiteren Einfluss auf die Funktionsfähigkeit von TRAIL-R1 und -R2 könnten die beiden Decoy-Rezeptoren haben, die auf bisher nicht vollständig geklärte Weise die TRAIL-vermittelte Apoptose hemmen können. Beschrieben ist, dass TRAIL-R4 mit TRAIL-R2 Komplexe bildet (nicht aber mit TRAIL-R1) und somit die Entstehung eines funktionellen DISC und folglich auch die TRAIL-induzierte Apoptose hemmt (Merino et al, 2006). Da in den durchgeführten Immunpräzipitationsexperimenten Decoy-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden konnten, ist dies jedoch als Ursache für die Inaktivität des TRAIL-R2 nach TRAIL-Stimulation auszuschließen.

Ein weiteres Ergebnis hingegen könnte die oben dargestellten Phänomene insbesondere im Hinblick auf die Stimulationsart erklären. Wie beschrieben, zeigte der Nachweis des TRAIL-R2 im Gesamtzelllysat der untersuchten Zelllinien eine weitere spezifische Bande in Höhe von ~32kDa, die mittels siRNA-Experimenten als eine Form des TRAIL-R2 identifiziert werden konnte. Kürzlich identifizierten *Wagner et al* eine nicht-glykosilierte Form von TRAIL-R2, die dieser Molekulargröße entspricht (Wagner et al, 2007). Es könnte sich folglich bei dieser kleinen TRAIL-R2 Form um die nicht-glykosilierte TRAIL-R2-Form handeln. *Wagner et al* zeigten weiter, dass diese nicht-glykosilierte TRAIL-R2-Form die Bildung des DISC verhindert und so die TRAIL-induzierte Apoptose hemmt (Wagner et al, 2007). Interessanterweise zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente, dass die kleine TRAIL-R2-Form an den DISC nach TRAIL-Stimulation, nicht aber an den DISC nach HGS-ETR2-Stimulation rekrutiert wird. Die vorliegenden Ergebnisse sind somit ein Hinweis darauf, dass die Rekrutierung einer nicht-glykosilierten TRAIL-R2-Form für die Inaktivität des TRAIL-R2 nach TRAIL-Stimulation verantwortlich sein könnte.

Darüberhinaus überraschte ein weiteres Ergebnis der TRAIL-R-Komplex-Analyse. So konnte Caspase-10 in nicht-stimulierten Zellen nachgewiesen werden, jedoch ausschließlich in Assoziation mit TRAIL-R2, nicht aber mit TRAIL-R1. Im DISC nach agonistischer TRAIL-R-Antikörper Stimulation war Caspase-10 nicht mehr nachweisbar. Caspase-10 ist -wie Caspase-8- als Protein beschrieben, dass über FADD an die Todesdomäne der TRAIL-Rezeptoren bindet und die pro-apoptotische Signalkaskade aktiviert. Inwieweit Caspase-8 und Caspase-10 unterschiedliche Funktionen in TRAIL-induzierten Signalwegen wahrnehmen, ist nicht bekannt. In der Literatur beschrieben ist die Beobachtung, dass TRAIL-R2-Neutralisation die

Caspase-10-abhängige Apoptose in Mammakarzinom-Zellen abschwächt – jedoch nur bei sehr geringen TRAIL-Konzentrationen (Engels et al, 2005). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass Pankreaskarzinom-Zellen selbst TRAIL exprimieren, wäre es möglich, dass eine autokrine TRAIL-Stimulation zu einer Caspase-10-Rekrutierung an TRAIL-R2 führt. Dies könnte erklären, warum Caspase-10 in der durchgeführten Immunpräzipitation in nicht-stimulierten Zellen in Assoziation mit TRAIL-R2 nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits erwähnt, induziert TRAIL neben Zelltod auch nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Signalwege. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung dieser Signalwege der pro-apoptotische Weg dramatisch verstärkt werden kann (Trauzold et al, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Rolle TRAIL-R1 und TRAIL-R2 bei diesen Effekten spielen. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten zeigten die Ergebnisse, dass sowohl die Hemmung von MEK als auch die Hemmung von PKC zu einer Sensibilisierung für TRAIL-induzierte Apoptose führt. Überraschenderweise zeigte sich jedoch bei der Verwendung von antagonistischen und agonistischer TRAIL-R-Antikörpern eine unterschiedliche Beteiligung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2. So führte die Hemmung der MEK mittels UO126 zu einer Sensibilisierung nur über TRAIL-R1, wohingegen die Hemmung der PKC mittels GÖ6983 zu einer Sensibilisierung über beide Rezeptoren führte, nachdem die Zellen mit TRAIL oder agonistischen TRAIL-R-Antikörpern stimuliert wurden. Diese Ergebnisse machen zum einen deutlich, dass intrazelluläre Signalwege in unterschiedlicher Weise beteiligt sind, abhängig davon ob TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 aktiviert wurde. Zum anderen bestätigten diese, dass der TRAIL-R2 prinzipiell funktionsfähig ist, da er durch Hemmung der anti-apoptotischen PKC reaktiviert werden kann.

Sowohl die funktionellen Untersuchungen als auch die Analyse der Rezeptorkomplexe haben gezeigt, dass zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Unterschiede bestehen, die entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität haben. Parallel durchgeführte immunozytologische Untersuchungen der zellulären Lokalisation von TRAIL-Rezeptoren zeigten ein weiteres unerwartetes Ergebnis. So

konnte mittels der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie gezeigt werden, dass TRAIL-R2 nicht nur, wie zu erwarten, auf der Zellmembran und im Zytoplasma vorkommt, sondern zusätzlich massiv im Zellkern exprimiert wird. Diese ungewöhnliche Zelllokalisierung für einen Todesrezeptor konnte nur für TRAIL-R2, nicht aber für TRAIL-R1 gezeigt werden: ein weiterer, gravierender Unterschied zwischen beiden Rezeptoren mit möglicherweise entscheidenden funktionellen Auswirkungen. Eine daraufhin durchgeführte Immunpräzipitation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2, anschließende Isolierung und Identifizierung der ko-präzipitierten Proteine mittels MALDI Massenspektrometrie führte zu einem weiteren interessanten Ergebnis. So konnten in Assoziation mit TRAIL-R2 14 Proteine identifiziert werden, die am Splicing und der Regulation der Genexpression beteiligt sind (u.a. DEAD box Protein p68, hnRPA1, hnRNP A2/B1). Keines dieser Proteine konnte in Assoziation mit TRAIL-R1 identifiziert werden. Diese Ergebnisse, insbesondere im Zusammenhang mit der zuvor beobachteten Zellkernlokalisierung des TRAIL-R2, geben dringende Hinweise darauf, dass TRAIL-R2 an einer bisher unbeschriebenen Aufgabe in der Regulation der Genexpression und am Splicing beteiligt sein könnte. Ein Zusammenhang zwischen einer solchen Funktion und der beschriebenen Inaktivität des TRAIL-R2 nach TRAIL-Stimulation wäre ebenfalls denkbar.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 als zwei unterschiedliche Rezeptoren betrachtet werden müssen. Beide Rezeptoren unterschieden sich in komplexer Weise in der Aktivität in Abhängigkeit von der Stimulationsart, in der Rezeptorkomplex-Zusammensetzung und in den beteiligten Signalwegen. Dies dürfte insbesondere unter klinischen Gesichtspunkten für den therapeutischen Einsatz von TRAIL oder TRAIL-R-Agonisten von Interesse und Wichtigkeit sein. Darüberhinaus liefern die vorgestellten Daten Hinweise darauf, dass TRAIL-R2 eine bisher unbeschriebene Aufgabe in der Regulation der Genexpression und am Splicing wahrnehmen könnte.

5. Ausblick und Fazit

In anschließenden Projekten sollten entscheidende Fragen, die sich nach Betrachtung der dargestellten Ergebnisse aufdrängen, geklärt werden. Zum einen sollte die Apoptose-induzierende Funktion beider Rezeptoren weiter charakterisiert werden, da die Ergebnisse entscheidenden und direkten Einfluss auf den klinischen Einsatz von TRAIL und TRAIL-R-Agonisten haben werden. In diesem Zusammenhang sollte insbesondere die Identität der kleineren TRAIL-R2-Form weiter charakterisiert werden. Hierzu stehen Glykolisierungs-Inhibitoren sowie verschiedenen Protease-Inhibitoren zur Verfügung. Weiter sollte untersucht werden, ob diese Form tatsächlich an der Inaktivierung des TRAIL-R2 nach TRAIL-Stimulation in Pankreaskarzinom-Zellen beteiligt ist. Entscheidende Hinweise darauf konnte die vorliegende Arbeit bereits liefern. Darüber hinaus muss die Funktion der Caspase-10 evaluiert werden. Auch hier könnten siRNA-Versuche und die Verwendung von spezifischen Caspase-Inhibitoren weiteren Aufschluss liefern, der direkte klinische Relevanz haben könnte.

Insbesondere aber muss auch die Aufgabe des TRAIL-R2 im Zusammenhang mit der beschriebenen Kernlokalisation und Interaktion mit Splicing-Proteinen geklärt werden. Zunächst sollte mittels Western-Blot-Technik eine Assoziation von TRAIL-R2 und identifizierten Kernproteinen verifiziert werden. Die Identifizierung einer Funktion des TRAIL-R2 im Zusammenhang mit der Regulation der Genexpression und des Splicing sollte bei entsprechender Verifizierung der beschriebenen Phänomene das Ziel sein.

Hinzu kommt, dass in allen beschriebenen Effekten die Aufgabe des endogen exprimierten TRAIL unklar bleibt. Untersucht werden sollte deshalb, welche Rolle das endogene TRAIL übernimmt. Hierzu kann TRAIL mittels siRNA oder antagonistischer Antikörper inhibiert werden. Anschließende Untersuchung der TRAIL-induzierten Apoptose, pro-inflammatorischen Antwort, Kernlokalisation von TRAIL-R2, Assoziation von TRAIL-R2 mit Caspase-10 und Kernproteinen könnte weiteren Aufschluss über die Rolle des endogenen TRAIL geben. Als weiteres Werkzeug für zukünftige Experimente stehen chimäre TRAIL-Rezeptor-Mutanten zur Verfügung, bei denen die intrazelluläre Domäne des CD40 durch die intrazelluläre Domäne des TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 ersetzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Rezeptor-Mutanten bereits in Panc89 Zellen transfiziert und stabile Klone generiert

(Daten nicht gezeigt). Auch die Verwendung dieser Rezeptor-Mutanten könnte bei der Klärung der offenen Fragen helfen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein besseres Verständnis der TRAIL-induzierten Signalübertragung in Hinblick auf die beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Die Ergebnisse der Arbeit machen deutlich, dass weitere intensive Arbeit erforderlich ist, um insbesondere bisher unbeschriebene Aufgaben von TRAIL-Rezeptoren zu verstehen. Dieses Verständnis ist unabdingbar für den sicheren, therapeutischen Einsatz von TRAIL oder TRAIL-Rezeptor-Agonisten.

6. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom hat trotz chirurgischer und chemotherapeutischer Therapie eine infauste Prognose. Seit einiger Zeit wird TRAIL als neue Therapieoption für Malignome erprobt. TRAIL ist ein Todesligand, der in Tumorzellen Apoptose auslösen kann, andere Zellen jedoch unbeschadet lässt. Neben TRAIL werden auch monoklonale agonistische Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren in klinischen Studien eingesetzt. Da TRAIL an zwei unterschiedliche Todesrezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) binden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit die spezifischen Funktionen der beiden Rezeptoren in Pankreaskarzinom-Zellen untersucht.

Die TRAIL-Rezeptor-Expression von Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde mittels Western-Blot und Durchflusszytometrie analysiert. Pankreaskarzinom-Zellen wurden mit TRAIL oder mit, bereits in klinischen Studien evaluierten, agonistischen Antikörpern HGS-ETR1 (aktiviert TRAIL-R1) und HGS-ETR2 (aktiviert TRAIL-R2) stimuliert. Zur Hemmung des jeweiligen Rezeptors wurden antagonistische anti-TRAIL-R1/-TRAIL-R2-Antikörper verwendet. Zur Inhibition von PKC wurde GÖ6983 und zur Inhibition von MEK UO126 eingesetzt. Vitalität der Zellen wurde mittels Kristallviolett-Assay, NF- κ B-Induktion mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) und Sezernierung von IL8 mittels ELISA bestimmt. Rezeptor-Lokalisation wurde mittels Immunfluoreszenz, die Rezeptorkomplexe wurden mittels Immunopräzipitation analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf der Zelloberfläche exprimierten. Weiter induzierte TRAIL in diesen Zellen Apoptose und eine pro-inflammatorische Antwort (NF- κ B und IL-8). Interessanterweise zeigte der Einsatz von antagonistischen Antikörpern gegen TRAIL-R1 bzw. -R2 in Kombination mit TRAIL-Stimulation, dass die TRAIL-induzierte Apoptose und nicht-apoptotische Antwort fast ausschließlich über TRAIL-R1 vermittelt wird. Dass jedoch beide Rezeptoren potentiell funktionsfähig sind, zeigte die Stimulation mit agonistischen Antikörpern. Sowohl HGS-ETR1 als auch HGS-ETR2 induzierten Apoptose, NF- κ B und IL-8. Die Analyse der Rezeptorkomplexe zeigte, dass TRAIL-Stimulation zur Entstehung von Heterokomplexen aus TRAIL-R1 und TRAIL-R2, die Stimulation mit agonistischen Antikörpern hingegen zur Entstehung von Homokomplexen aus entweder TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 führt. Weiter konnte nach TRAIL-Stimulation eine weitere, kleinere TRAIL-R2-Form

identifiziert werden, die in der Molekulargröße einer nicht-glykosilierten Form entspricht. Die Untersuchung von Signaltransduktionswegen zeigte, dass die Hemmung von MEK Pankreaskarzinom-Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose ausschließlich über TRAIL-R1 sensibilisiert. Hingegen sensibilisiert die Hemmung von PKC die TRAIL-vermittelte Apoptose über beide Rezeptoren. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass TRAIL-R1 und -R2 auf der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisiert sind. Interessanterweise konnte TRAIL-R2 zusätzlich auch im Zellkern nachgewiesen werden. Parallel durchgeführte Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung und Identifizierung der Rezeptor-assoziierten Proteine zeigte, dass TRAIL-R2 (nicht aber TRAIL-R1) mit zahlreichen Kernproteinen assoziiert ist, die am Splicing und der Regulation der Genexpression beteiligt sind.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Pankreaskarzinom-Zellen funktionsfähigen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 exprimieren, die nach selektiver Stimulation beide Apoptose auslösen können. Die apoptotische und pro-inflammatorische Antwort nach Stimulation mit dem natürlichen Liganden TRAIL wird jedoch nahezu ausschließlich über TRAIL-R1 vermittelt. Interessanterweise kann der TRAIL-R2 durch die Hemmung der anti-apoptotischen PKC reaktiviert werden. Eine mögliche Erklärung für die Inaktivität des TRAIL-R2 ist die Bildung von Heterokomplexen nach TRAIL-Stimulation oder der Einfluss der nicht-glykosilierten TRAIL-R2-Form. Zusätzlich lieferten die Ergebnisse dringende Hinweise auf die Beteiligung von TRAIL-R2 an Splicing- und Genregulationsvorgängen.

7. Literaturverzeichnis

Anel A, Bosque A, Naval J, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Martinez-Lorenzo MJ. (2007) Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Front Biosci*, 12, 2074-2084

Ashkenazi A, Herbst RS (2008) To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest*, 118, 1979-1990

Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104, 155-162

Bardeesy N, DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, 2, 897-909

Böcker W, Denk H, Heitz P. (2004) *Pathologie*, 3. Auflage, Urban & Fischer, München

Bodmer JL, 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. *Nat Cell Biol*, 2, 241-243

Bruch H-P, Trentz, O. (2006) *Chirurgie*, 5. Auflage, Urban & Fischer, München

Cretney E, McQualter JL, Kayagaki N, Yagita H, Bernard CC, Grewal IS, Ashkenazi A, Smyth MJ (2005) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol Cell Biol*, 83, 511-519

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG (1997a) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, 7: 813-820

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA (1997b) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*, 186, 1165-1170

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, 273, 14363-14367

Engels IH, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2005) Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Mol Cell Biol*, 25, 2808-2818

Feinberg B, Kurzrock R, Talpaz M, Blick M, Saks S, Gutterman JU (1988) A phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients. *J Clin Oncol*, 6, 1328-1334

Greco FA, Bonomi P, Crawford J, Kelly K, Oh Y, Halpern W, Lo L, Gallant G, Klein J (2008) Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, 61, 82-90

Herbst RS (2006) A phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant Apo2L/TRAIL, an apoptosis-inducing protein in patients with advanced cancer [abstract]. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 3013.

Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kalthoff H, Ungefroren H (2000) Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19, 5477-5486

Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX, Siu LL, Le LH, Corey A, Iacobucci A, MacLean M, Lo L, Fox NL, Oza AM (2008) A phase 1 study of mapatumumab (fully human

monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*, 14, 3450-3455

Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM (1999) Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell*, 4, 563-571

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195

Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ (2006) Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J of Physiol*, 290, 129-136

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58, 71-96

Katsikis PD, Garcia-Ojeda ME, Torres-Roca JF, Tijoe IM, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA (1997) Interleukin-1 beta converting enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection. *J Exp Med*, 186, 1365-1372

Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, Mathieu M, Billeci K, Deforge L, Pai R, Hymowitz SG, Ashkenazi A (2005) Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem*, 280, 2205-2212

Kelley SK, Harris LA, Xie D, Deforge L, Totpal K, Bussiere J, Fox JA (2001) Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related

apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther*, 299, 31-38

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12, 611-620

Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*, 276, 46639-46646

Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, Röder C, Schütze S, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A (2010) TRAIL signalling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J Mol Med* (zur Veröffentlichung angenommen)

Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE (2008) Multiple effects of TRAIL in human carcinoma cells: induction of apoptosis, senescence, proliferation, and cytokine production. *Exp Cell Res*, 314, 1605-1616

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490

MacFarlane M (2003) TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*, 139, 89-97

MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, 272, 25417-25420

MacFarlane M, Inoue S, Kohlhaas SL, Majid A, Harper N, Kennedy DB, Dyer MJ, Cohen GM (2005) Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death Differ*, 12, 773-782

Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol*, 26, 7046-7055

Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y (2001) *J Exp Med.*, 193, 651-660

Mongkolsapaya J, Cowper AE, Xu XN, Morris G, McMichael AJ, Bell JI, Screaton GR (1998) Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol*, 160, 3-6

Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY, Screaton GR (1999) Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol*, 6, 1048-1053

Muhlenbeck F, Schneider P, Bodmer JL, Schwenzler R, Hauser A, Schubert G, Scheurich P, Moosmayer D, Tschopp J, Wajant H (2000) The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J Biol Chem*, 275, 32208-32213

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-809

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997a) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-113

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997b) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277, 815-818

Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM (1998) TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.*, 424, 41-45

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 271, 12687-12690

Plummer R, Attard G, Pacey S, Li L, Razak A, Perrett R, Barrett M, Judson I, Kaye S, Fox NL, Halpern W, Corey A, Calvert H, de Bono J (2007) Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res*, 13, 6187-6194

Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM (2004) The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell*, 15, 2834-2841

Rathmell JC, Thompson CB (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 17, 781-828

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) *EMBO J*, 17, 1675-1687

Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI (1997) TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol*, 7, 693-696

Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, Kanaly ST, Williamson E, Kayagaki N, Yun T, Smolak P, Le T, Goodwin R, Gliniak B (2002) Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol*, 32, 2246-2254

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277, 818-821

Siegmund D, Klose S, Zhou D, Baumann B, Roder C, Kalthoff H, Wajant H, Trauzold A (2007) Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell Signal*, 19, 1172-1184

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319

Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrott RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2001) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med*, 193, 661-670

Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*, 21, 4520-4530

Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12, 599-609

Strater J, Walczak H, Pukrop T, Von Muller L, Hasel C, Kornmann M, Mertens T, Moller P (2002) TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology*, 122, 659-666

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med*, 195, 161-169

Tecchio C, Huber V, Scapini P, Calzetti F, Margotto D, Todeschini G, Pilla L, Martinelli G, Pizzolo G, Rivoltini L, Cassatella MA (2004) IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*, 103, 3837-3844

Trauzold A, Schmiedel S, Roder C, Tams C, Christgen M, Oestern S, Arlt A, Westphal S, Kapischke M, Ungefroren H, Kalthoff H (2003) *Br J Cancer*, 89, 1714-1721

Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Roder C, Kalthoff H, Wajant H (2006) TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 25, 7434-7439

Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schutze S, Schafer H, Oestern S, Roder C, Ungefroren H, Lampe E, Heinrich M, Walczak H, Kalthoff H (2001) CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 20, 4258-4269

Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, McLaughlin MM, Srinivasula SM, Livi GP, Marshall LA, Alnemri ES, Williams WV, Doyle ML (2000) Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem*, 275: 23319-23325

Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L, Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Med*, 13, 1070-1077

Wajant H (2004) TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vit Horm*, 67, 101-132

Wajant H, Moosmayer D, Wuest T, Bartke T, Gerlach E, Schonherr U, Peters N, Scheurich P, Pfizenmaier K (2001) Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*, 20, 4101-4106

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*, 16, 5386-5397

Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Med*, 5, 157-163

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*; 3, 673-82

8. Danksagung

Mein aufrichtiger und besonders herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD. Dr. Anna Trauzold für die fortwährende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Ania Trauzold hat mich angeleitet, mich in besonderem Maße gefördert, gefordert und mich für die wissenschaftliche Arbeit begeistert. Dafür bedanke mich bei ihr sehr herzlich!

Weiter bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff für die Bereitstellung meiner Doktorandenstelle, für fortwährende Herausforderungen und für die stetigen, konstruktiven Diskussionen.

An Andreas Noack richtet sich mein freundschaftlicher Dank für Kollegialität und Unterstützung während meiner praktischen Arbeit im Labor.

Für die technische Unterstützung danke ich Dr. Christian Röder, Dr. Hans-Heiner Oberg und Birgit Fricke.

Mein sehr persönlicher Dank richtet sich an meine Eltern, die meine gesamte Ausbildung ermöglicht und gefördert haben, und mir zusammen mit meiner Freundin Julia jederzeit liebevoll zur Seite standen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johannes Lemke
 Geburtsdatum: 19. August 1983
 Geburtsort: Hamburg
 Familienstand: ledig

Ärztliche Tätigkeit

Seit August 2010 Weiterbildungsassistent zum Facharzt für
 Viszeralchirurgie in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-
 und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Ulm

Studium der Humanmedizin

2009 bis 2010 Universität Ulm (Praktisches Jahr)
 2003 bis 2009 Universität zu Lübeck

August 2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note gut)
 August 2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note sehr gut)

Schulbildung

2001 bis 2003 Gymnasium Stormarnschule, Ahrensburg
 2000 bis 2001 Truman High School, Independence, USA
 1994 bis 2000 Gymnasium Stormarnschule, Ahrensburg

2003 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,5)
 2001 US High School Diploma

Promotion

09/2007 bis 10/2008 Experimentelle Promotionsarbeit in der Sektion
 Molekulare Onkologie des Instituts für experimentelle
 Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Wintersemester 2007/08 Promotionssemester

Publikation

Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, Röder C, Schütze S, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A (2010) **TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5.** J Mol Med, 88, 729-40.

Poster-Beiträge

Lemke J, Noack A, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. **Different Functions of TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5) in Pancreatic Tumor Cells.** Poster: 15th International AEK Cancer Congress, Berlin (2009)

Lemke J, Redmer T, Noack A, Heise D, Kalthoff H, Trauzold A. **Impact of Catechingallate on Death-Receptor-Mediated Apoptosis.** Poster: European Workshop on Cell Death, Hauenstein (2008)

Stipendien und Auszeichnung

Promotionsstipendium des SFB 415

Auszeichnung und Reisestipendium der Berliner Krebsgesellschaft
(International AEK Cancer Congress, Berlin, 2009)

Reisestipendium der Europäischen Union (Marie Curie Grant)
(Baltic Summer School, Lund, Schweden, 2007)