

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Walter Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

**FUNKTIONELLE ANALYSEN ZUR PROLIFERATIONSHemmUNG
UND APOPTOSEINDUKTION
ZYTOSTATIKARESISTENTER OVARIALKARZINOMZELLEN
DURCH DEN ZUR TUMORNEKROSEFAKTOR-FAMILIE GEHÖRIGEN LIGANDEN
TRAIL**

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

vorgelegt von
JULIA BIERNATH-WÜPPING
aus Kiel

Kiel 2011

1. Berichterstatter: **Priv.-Doz. Dr. Meinhold-Heerlein**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Kalthoff**

Tag der mündlichen Prüfung: **28.11.2011**

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: **28.11.2011**

Gez.: Prof. Dr. Cascorbi
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Ovarialkarzinom	1
1.2. TRAIL-induzierte Apoptose	5
1.2.1. Apoptose.....	5
1.2.2. TRAIL-Signalweg.....	5
1.3. Kombination mit PPAR γ -Liganden.....	7
1.4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Material.....	11
2.1.1. Zellkultur.....	11
2.1.2. Kristallviolettassay.....	12
2.1.3. Dapi-Färbung.....	12
2.1.4. Western-Blot.....	12
2.1.5. Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.6. Geräte.....	16
2.2. Methoden.....	18
2.2.1. Zellkultur.....	18
2.2.2. Proliferationsstudien.....	18
2.2.2.1. Zellstimulation mit TRAIL.....	18
2.2.2.2. Kombinationsbehandlung von TRAIL und PPAR γ -Liganden.....	19
2.2.2.3. Kombinationsbehandlung von TRAIL und PPAR γ -Liganden-Inhibitor.....	20
2.2.3. Kristallviolett-Assay.....	21
2.2.4. Dapi-Färbung.....	21
2.2.5. Western-Blot.....	22
2.2.5.1. Zellstimulation für Protein-Expressionsanalysen.....	22
2.2.5.2. Herstellung von Gesamtpoteinlysat.....	23
2.2.5.3. Gelelektrophorese.....	24
2.2.5.4. Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western Blot).....	25
3. Ergebnisse	27
3.1. Effekt der TRAIL-Behandlung.....	27
3.1.1. Proliferationshemmung durch TRAIL-Behandlung.....	27
3.1.2. Apoptoseinduktion durch TRAIL-Behandlung.....	28
3.1.3. Detektion der Proteinexpression der Schlüsselfaktoren des TRAIL-Signalweges.....	30
3.1.3.1. Detektion der Proteinexpression in unbehandelten Zellen.....	30
3.1.3.2. Detektion der Proteinexpression in TRAIL-behandelten Zellen.....	33
3.2. Effekt der Kombinationsbehandlung mit PPAR γ -Liganden.....	36
3.2.1. Proliferationshemmung unter Kombinationsbehandlung.....	36
3.2.2. Effekt von GW9662 auf die durch Kombinationsbehandlung hervorgerufene Proliferationshemmung.....	39
3.2.3. Synergistischer Effekt auf TRAIL-induzierte Apoptoseinduktion durch Kombinationsbehandlung mit PPAR γ -Liganden.....	40
3.2.4. Detektion der Proteinexpression der Schlüsselfaktoren nach Kombinationsbehandlung von TRAIL mit Ciglitazone und PGJ ₂	41
4. Diskussion.....	44
5. Zusammenfassung.....	50

6. Literaturverzeichnis.....	52
7. Danksagung.....	57
8. Lebenslauf.....	58

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Albumine Bovine Serum
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco Phosphate Buffered Saline
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilo-Dalton
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μM	micromolar
μl	Mikroliter
nM	Nanomol
ng	Nanogramm
pH	potentia hydrogenii
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor
15d-PGJ ₂	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
PVDF	Polyvinylidenefluorid
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N,N-Tetra-methyl-ethylendiamin
TNM	Tumor-Nodulus-Metastasen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

TTBS	Tris-buffered saline + 0,1 % Tween20
U	units
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
VLE-RPMI	very low endotoxin Kulturmedium
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1. Das Ovarialkarzinom

Die malignen Tumorerkrankungen zählen neben den kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland.

Nach Daten des Robert-Koch-Instituts von 2005/06 traten hierzulande rund 426.800 Krebsneuerkrankungen auf, wobei die häufigste Tumorlokalisation der Männer an der Prostata und der Frauen an der Brustdrüse zu finden ist, gefolgt von Neoplasien des Darms und der Lunge. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bösartige Erkrankungen der Ovarien näher untersucht.

Wie aus Abbildung 1 deutlich wird, liegt das Ovarialkarzinom mit ca. 9670 Neuerkrankungen pro Jahr auf Platz 5 (4,9 %) der bösartigen Neubildungen bei Frauen.

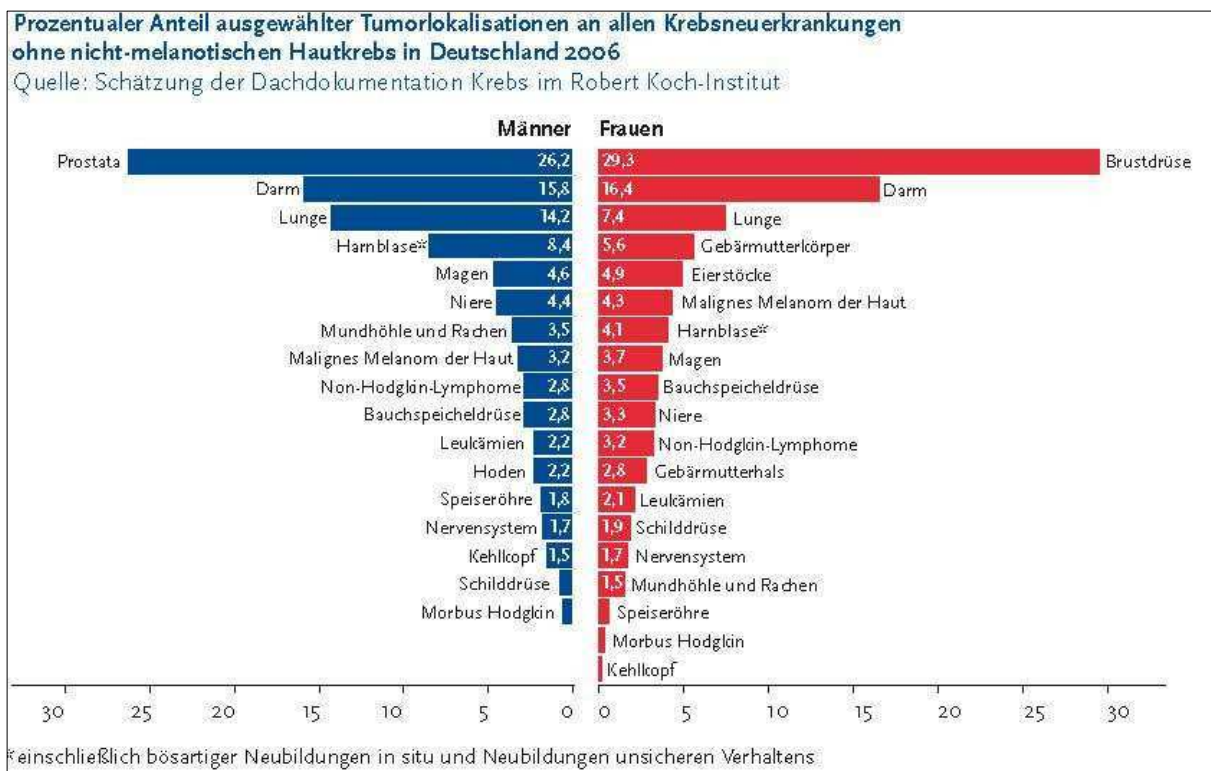


Abbildung 1: Prozentaler Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2005/06. Das Ovarialkarzinom nimmt mit 4,9 % Platz 5 ein. (Quelle: Internet-Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts)

Im gleichen Zeitraum wurden ca. 5.636 Todesfälle auf Grund dieser Erkrankung registriert, was 5,7 % aller Krebssterbefälle ausmacht und das Ovarialkarzinom somit an Platz 5 steht.

Obwohl die Mortalität in den letzten Jahren durch die Entwicklung und Einführung neuer Therapieansätze - bei ähnlich bleibenden Inzidenzen - leicht zurückgegangen ist (Abb.2), ist

sie immer noch doppelt so hoch wie beispielsweise die Mortalität des Gebärmutterkörperkrebses (2,4 % s. Abb. 3). Bösartige Neubildungen der Eierstöcke haben damit die höchste Mortalität unter den malignen Neubildungen der gynäkologischen Erkrankungen.

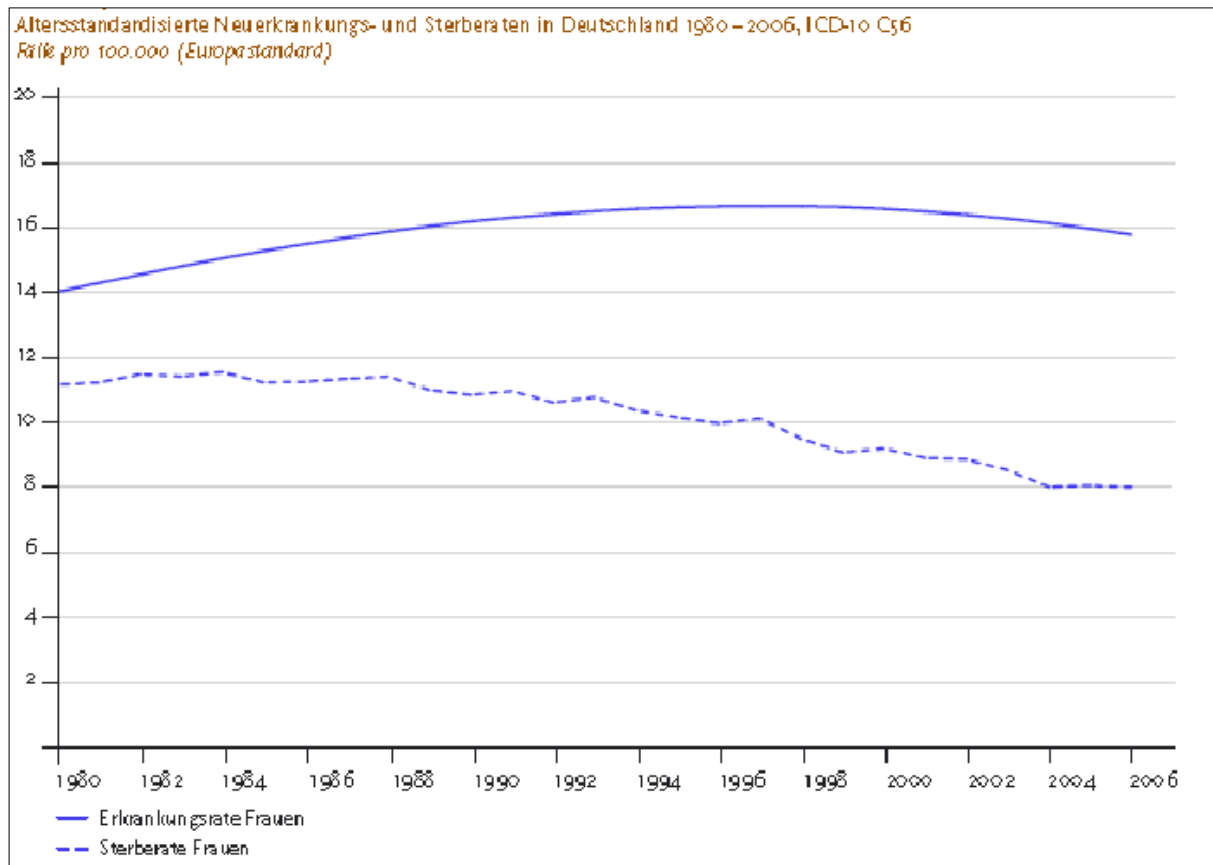


Abbildung 2: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms von 1980-2006 in Deutschland. Die Mortalität ist bei ähnlich bleibender Inzidenz in den letzten Jahren leicht zurückgegangen. (Quelle: Internet-Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts)

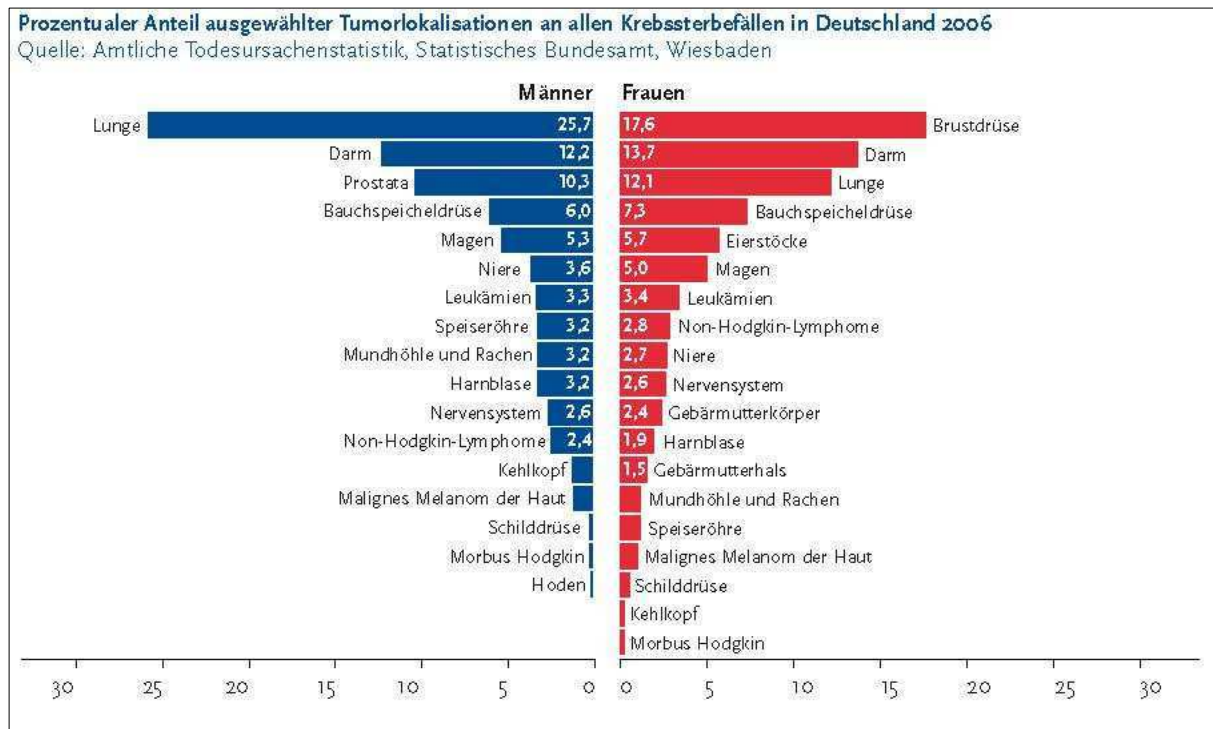


Abbildung 3: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2005/06. Zu den bei Frauen mit am häufigsten zum Tode führenden Malignomen nimmt das Ovariakarzinom mit 5,7 % Platz fünf unter allen Krebssterbefällen in Deutschland ein. (Quelle: Internet-Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts)

Das Risiko einer Frau in den westlichen Ländern im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs zu erkranken, liegt bei ca. 1-1,5 %, wobei die Ursachen dieses heimtückischen Krankheitsbildes auf einem multifaktoriellen Geschehen beruhen. Beobachtungen haben gezeigt, dass das Krebsrisiko unter anderem durch eine langjährige ovulatorische Aktivität, welche mit gehäuften Reparaturen des Oberflächenepithels des Ovars einhergeht, steigt. Die Verringerung der ovulatorischen Zyklen durch eine späte Menarch, frühe Menopause, Schwangerschaften, lange Stillzeiten und auch durch orale Kontrazeptiva bewirkt eine Senkung des Erkrankungsrisikos. Zudem sind weitere Risikofaktoren, die die Entstehung von Eierstockkrebs fördern, wie Angehörigkeit zur weißen Rasse, hoher sozioökonomischer Status, positive Familienanamnese und Rauchen, beschrieben worden (Partridge et al., 1999, Holschneider and Berek, 2000).

Zur Erhebung der Diagnose werden neben der Kranken- und Familienanamnese bildgebende Maßnahmen, wie transvaginale Sonographie, die den höchsten Stellenwert genießt, Röntgen- und Computertomographie bzw. Magnetresonanztomographie, eingesetzt. Dennoch besitzt das Ovariakarzinom unter allen gynäkologischen Erkrankungen immer noch eine besonders schlechte Prognose, da bisher geeignete Früherkennungsmaßnahmen fehlen (Cannistra et al.,

2004). Darüber hinaus präsentiert es sich im Gegensatz zu anderen Malignomen anfangs kaum und später mit eher unspezifischen Symptomen, so dass die Erkrankung bei ca. 80 % der Patientinnen erst in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium (FIGO III) diagnostiziert wird (Holschneider and Berek, 2000).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland liegt zwischen 35 % und 49 %.

Tabelle 1: 5-Jahres Überlebensrate für die einzelnen FIGO-Stadien beim Ovarialkarzinom

FIGO-Stadium	Inzidenz	5-Jahres-Überlebensrate
I	26 %	60-90 %
II	15 %	40-70 %
III	43 %	4-15 %
IV	16 %	0-5 %

Die Stadieneinteilung nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und die TNM-Klassifikation (Tumor-Nodus-Metastasen) werden genutzt, um nach streng pathologisch-anatomischen Gesichtspunkten die Tumorausdehnung zu beschreiben, da generell gilt: je besser das Staging, desto besser die Prognose.

Die Therapie richtet sich nach der FIGO-Einteilung und besteht primär aus den beiden Säulen der Operation und Chemotherapie (Leitlinien, 2000, Pfisterer and du Bois, 2007). Trotz optimaler operativer Reduktion der Tumormassen und verbesserten medikamentösen Behandlungsstrategien erleiden die Mehrzahl der Patientinnen ein Rezidiv mit konsekutiver Zytostatikaresistenz, für welches die Überlebensprognosen derzeit äußerst schlecht sind, so dass mittelfristig ca. die Hälfte der Frauen, die primär an einem Ovarialkarzinom erkrankt sind, auch an diesem versterben werden (Cannistra et al., 2004, Partridge et al., 1999).

Dieser heimtückischen Erkrankung kommt somit eine ganz besondere sowohl gesundheitliche, als auch gesellschaftliche Bedeutung zu, so dass es gilt, neue Therapieansätze, wie Gen- und Immuntherapien zu etablieren.

1.2. TRAIL-induzierte Apoptose

1.2.1. Apoptose

Zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelltod im menschlichen Körper nutzt dieser den Mechanismus der Apoptose, welches ein programmiertes Selbstmordprogramm für veraltete und genetisch veränderte Zellen darstellt. Die Apoptose ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren, lässt sich jedoch grundsätzlich in zwei Signalwege, den intrinsischen und den extrinsischen, unterscheiden. Für die Aktivierung des intrinsischen (mitochondrialen) Weges ist die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien charakteristisch, während die Aktivierung der Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie durch die korrespondierenden Liganden (z. B. TNF- α , FAS-ligand, TRAIL) den extrinsischen Weg induziert (Ghobrial et al., 2005, Hanahan et al., 2000). Beide Wege treffen in der Aktivierung der Caspase 3 aufeinander und induzieren somit eine Kaskade von Caspasen (Proteasen), die das Sterben der Zelle verursachen (Hengartner, et al., 2000, Meinhold-Heerlein et al., 2005). Um eine überschießende Apoptosereaktion zu verhindern, sind in diesem gemeinsamen Weg negative Regulatoren, die sogenannten "inhibitors of apoptosis proteins" (IAP), zwischengeschaltet.

Die gängigen beim Ovarialkarzinom eingesetzten Zytostatika aktivieren den intrinsischen Signalweg (Meinhold-Heerlein et al., 2004, Meinhold-Heerlein et al., 2005). Wie schon in der Arbeit von *Meinhold-Heerlein* beschrieben wurde, kann durch eine zusätzliche Induktion des extrinsischen Weges ein synergistischer Effekt auf die Apoptose erzielt werden.

1.2.2. TRAIL-Signalweg

TRAIL ist ein 34000 Dalton großes Protein, welches als Typ-II-transmembranöses Protein in die Familie der TNF-Liganden gehört (Ashkenazi and Dixit, 1998). Sowohl TRAIL, als auch seine Rezeptoren werden in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert, induzieren aber ausschließlich in malignen Zellen den apoptotischen Zelltod. Wie in der Publikation von Trauzold und Mitarbeitern beschrieben, kann TRAIL aber auch unter bestimmten Bedingungen Progress und Metastasenbildung begünstigen (Trauzold et al., 2006).

Für TRAIL existieren zwei apoptotisch wirkende Todesrezeptoren (s. Abb. 4): DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2), die selektiv Apoptose in Tumorzellen, nicht aber in physiologischen Geweben verursachen (Hao et al., 2001, Pan et al., 1997b, Ashkenazi et al., 1999).

Daneben existieren noch zwei weitere membranständige Rezeptoren, die sogenannten Decoy-Rezeptoren DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4), an welche TRAIL binden kann, jedoch leiten sie aufgrund fehlender funktioneller intrazellulärer Domäne kein Apoptosesignal weiter (Pan et al., 1997a).

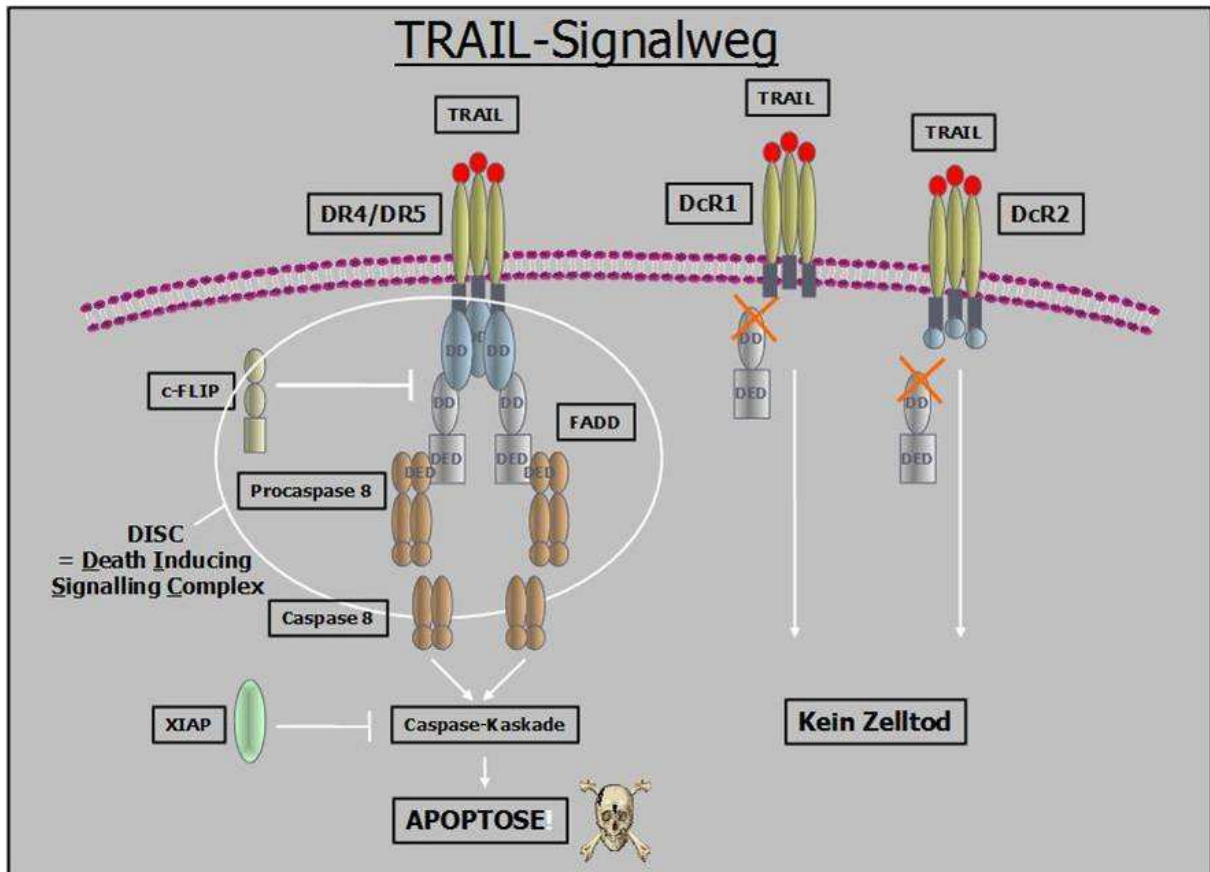


Abbildung 4: Der TRAIL-Signalweg. Die Anlagerung von TRAIL bewirkt die Trimerisierung der korrespondierenden Rezeptoren DR4 und DR5 (TRAIL-R1, -R2). Die Rekrutierung von FADD und Procaspase 8 führt zur Aktivierung von Caspase 8 und zur Induktion von Apoptose. Die Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 (TRAIL-R3, -R4) können TRAIL binden, aber kein apoptotisches Signal vermitteln. c-Flip inhibiert den Signalweg durch kompetitive Bindung an FADD und XIAP greift negativ regulierend in die Caspasekaskade ein.

Die Anlagerung von TRAIL an einem der vier Rezeptoren bewirkt zunächst eine Trimerisierung dieser, aber nur wenn es zur Aktivierung einer der agonistischen Rezeptoren DR4 oder DR5 kommt, kann das apoptotisch wirkende Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet werden (Pitti et al., 1996, Wiley et al., 1995). Der Rezeptor bindet über seine intrazelluläre Todesdomäne („Death Domain“ DD) das proapoptotische Adapterprotein FADD („Fas-associated death domain protein“), welches seinerseits über seine DED („death effector domain“) mit dem proapoptotischen Protein Procaspase 8 interagiert (Bodmer et al., 2000).

Der so entstandene Komplex aus Ligand, Rezeptor, FADD und Procaspase 8 wird als DISC („death inducing signaling complex“) bezeichnet und führt zur Aktivierung der Caspase 8. Sie liegt als Heterotetramer bestehend aus je zwei Untereinheiten und zwei katalytischen Zentren vor. Durch ihre Spaltung kommt es zur Aktivierung der proapoptotischen Caspasenkaskade, bestehend aus den sogenannten Effektorcaspasen 3, 6 und 7: daher wird die Caspase 8 auch als die Initiatorcaspase des extrinsischen Signalwegs verstanden (Bodmer et al., 2000).

Zwei wichtige negative Regulatoren können die Apoptose an unterschiedlichen Stellen hemmen. Das antiapoptotische Protein cFlip („cellular FLICE inhibitory protein“), ein der Caspase 8 ähnliches Molekül ohne katalytisches Zentrum, verhindert die Entstehung des „DISC“, wodurch es nicht zur Spaltung der Procaspase 8 in ihre aktive Form kommen kann (Irmeler et al., 1997). Eine Überexpression dieses Moleküls wurde schon in mehreren Arbeiten als ein möglicher Mechanismus der TRAIL-Resistenz von Ovarialkarzinom-Zelllinien diskutiert (Vignati et al., 2002, Tomek et al., 2004, Safa et al., 2008).

In die zur Apoptose führende Caspasenkaskade greifen die negativ regulierenden Proteine der IAPs („inhibitors of apoptosis proteins“) ein. In dieser Arbeit wurde speziell das Protein XIAP untersucht, da in vorherigen Arbeiten eine Überexpression als möglicher Resistenzfaktor diskutiert wurde (Asselin et al., 2001, Sasaki et al., 2000, Yang et al., 2005).

1.3. Kombination mit PPAR (Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor)

γ -Liganden

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien durch eine Kombinationsbehandlung von TRAIL und verschiedenen Zytostatika ein Synergismus der Einzelsubstanzen erzielt wurde. Durch eine kombinatorische Behandlung können Zytostatika Ovarialkarzinomzellen gegenüber TRAIL sensitivieren (Cuello et al., 2001, Singh et al., 2003).

Dennoch gibt es Zelllinien, die trotz der Expression von TRAIL-Rezeptoren resistent gegenüber einer Behandlung mit TRAIL sind. Durch eine Behandlung mit den PPAR γ -Liganden Ciglitazone, Troglitazone und 15d-PGJ₂ (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂) lassen sich diese Zellen gegenüber TRAIL wieder sensitivieren (Sporn et al., 2001, Rumi et al., 2004).

Die PPAR γ -Liganden sind Stoffe, die an den intrazellulären Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Rezeptor binden. Dieser Rezeptor ist Mitglied der Steroid/Retinoid-Rezeptor Familie und wird als aktivierter Liganden-Rezeptor-Komplex in den Zellkern verlagert, wo dieser nur als Heterodimer mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (RXR, Retinoid-X-Rezeptor) an das DNA-Response-Element bindet, was zu einer Aktivierung der Gentranskription führt (Vignati et al., 2006, Semple et al., 2006).

Ursprünglich wurden die PPAR γ -Liganden in der Diabetestherapie als Insulin-Sensitivierer eingesetzt, da sie hauptsächlich im Fettgewebe vorkommen und hier durch eine Aktivierung der Rezeptoren zu einer verstärkten Glucoseaufnahme in die Zelle führen. In der Leber verringern sie die Gluconeogenese und erhöhen die Glycolyse. Darüber hinaus senken sie die Expression des Tumornekrosefaktor- α , der als Mitverursacher der Insulinresistenz vermutet wird (Fernandez-Veledo et al., 2009, Lebovitz and Banerji, 2001).

Der proapoptotische Effekt der PPAR γ -Liganden wurde in verschiedenen Studien untersucht; so wird in der Veröffentlichung von Kim et al. von 2002 die Herabregulation des antiapoptotischen Proteins cFlip durch die PPAR γ -Liganden als Mechanismus, der eine verstärkte TRAIL-Wirkung zulässt, diskutiert (Kim et al., 2000, Schultze et al., 2006, Zou et al., 2007). Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass das antiapoptotische Protein vermehrt ubiquitiniert und dann im Proteasom verdaut wird (Kim et al., 2002).

Auch das Protein XIAP greift hemmend in den apoptotischen TRAIL-Signalweg ein und eine Verminderung seiner Expression durch eine Behandlung mit 15d-PGJ₂ (Han et al., 2007) oder Troglitazone (Qiao et al., 2008) in Kombination mit TRAIL resultiert in einem signifikanten anti-kanzerogenen Effekt.

Die verminderte Expression von cFlip in Kombination mit der verstärkten Expression des Apoptose-induzierenden Rezeptors DR5 wird durch eine Behandlung mit den PPAR γ -Liganden über einen bisher unbekanntem Signalweg hervorgerufen und sensitiviert Tumorzellen für eine nachfolgende TRAIL-Behandlung (Schultze et al., 2006, Zou et al., 2007, Nakata et al., 2006).

Nakata et al. haben in ihrer Veröffentlichung von 2006 einen stabilisierenden Effekt von 15d-PGJ₂ auf die DR5-mRNA als einen möglichen Faktor für die verstärkte DR5-Expression resultierend in einer synergistischen Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose in neoplastischen Zellen diskutiert (Nakata et al., 2006).

Durch den Einsatz eines PPAR γ -Rezeptor Inhibitors (GW9662) sollte in vorangegangenen Studien untersucht werden, ob der sensitivierende Effekt der PPAR γ -Liganden auf die

TRAIL-induzierte Apoptose über den bekannten Signalweg abläuft oder ob es sich hierbei um einen unabhängigen Mechanismus handelt (Han et al., 2007). Sowohl die induzierte DR5-Regulation als auch die verminderte cFlip- und XIAP-Expression ließen sich nicht durch den Inhibitor verändern, was darauf schließen lässt, dass die PPAR γ -Liganden Troglitazone, Ciglitazone und 15d-PGJ₂ über einen unabhängigen, bisher nicht bekannten Signalweg die Apoptose synergistisch beeinflussen (Qiao et al., 2008, Han et al., 2007, Zou et al., 2007, Nakata et al., 2006).

1.4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Ovarialkarzinom hat unter den gynäkologischen Malignomen die schlechteste Prognose. Auch trotz optimaler operativer Reduktion der Tumormassen sowie verbesserter medikamentöser Therapie erleidet die Mehrzahl der Patientinnen ein Tumorrezidiv mit konsekutiver Zytostatikaresistenz. Die Überlebensprognose dieser Frauen ist sehr schlecht und mittelfristig verstirbt etwa die Hälfte an dieser heimtückischen Krankheit.

In verschiedenen vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass es durch den Einsatz von TRAIL zur selektiven Apoptoseinduktion in Karzinomzellen kommt, dennoch gibt es einige Zelllinien, die eine partielle TRAIL-Resistenz aufweisen.

Im Verlauf der experimentellen Versuche sollten unter Verwendung der Methoden Zellproliferationsassay und Dapi-Färbung als Apoptosenachweis und Western Blot zur Proteinexpressionsanalyse die folgenden einzelnen Fragestellungen geklärt werden:

Im ersten Teil der Arbeit galt es festzustellen, ob es in den sechs chemoresistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien, den Cisplatin-, Etoposid-, Docetaxel-, Paclitaxel-, Pemetrexed- und Gemcitabin-resistenten Heys, sowie in der parentalen Hey-Zelllinie und in der gegen TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie durch eine Behandlung mit aufsteigenden TRAIL-Konzentrationen in allen acht Zelllinien zu einer Wachstumshemmung kommt.

Falls dies der Fall sein sollte, ist es von Bedeutung, herauszufinden, bei welcher Konzentration die stärkste Proliferationshemmung eintritt und, ob es Unterschiede im Ansprechen der Zellen auf die Behandlung gibt.

Ob TRAIL das Potential besitzt, ein vermehrtes Auftreten von Apoptose unter den genannten Ovarialkarzinom-Zelllinien auszulösen, sollte im folgenden Experiment geklärt werden.

Hierzu diene die Färbung der zuvor mit TRAIL behandelten Zellen mit dem DNA-Farbstoff Dapi.

Für die folgenden Versuche stellte sich die Frage, in wie weit die Schlüsselfaktoren des TRAIL-Signalwegs, zu denen die vier TRAIL-Rezeptoren DR4, DR5, DcR1, DcR2, die antiapoptotischen Proteine cFlip und XIAP sowie die proapoptotischen Proteine FADD und Procaspase-8 gehören, ohne eine TRAIL-Behandlung in den acht Zelllinien exprimiert sind und wie sich ihre Expression bzw. Aktivität ändert, wenn die Karzinomzellen mit TRAIL behandelt werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob und auf welche Weise sich eine Kombinationsbehandlung von TRAIL und den PPAR γ -Liganden Troglitazone, Ciglitazone und 15d-PGJ₂ auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien auswirkt und, ob sich durch die Kombination eine Verstärkung des proliferationshemmenden Effekts erzielen ließe.

Darüber hinaus sollte durch den Einsatz des PPAR γ -Inhibitors GW9662 untersucht werden, ob die Wirkung der PPAR γ -Liganden über den bekannten Signalweg oder einen unabhängigen Weg verläuft.

Ebenso galt es herauszufinden, ob sich eine Kombinationsbehandlung auf die TRAIL-induzierte Apoptose auswirken würde und in wie weit sich die Proteinexpressionsmuster der Schlüsselfaktoren ändern.

Anhand der aufgeführten Einzelfragestellungen, die den durchgeführten Versuchen zu Grunde liegen, leitet sich die Hauptfragestellung der vorliegenden Arbeit ab.

Diese lautet: Vermag TRAIL einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Apoptoseinduktion von zytostatikaresistenten Zelllinien ausüben? Lässt sich durch die Kombination mit denen aus der Diabetestherapie bekannten PPAR γ -Liganden eine Verstärkung dieser Effekte erzielen, und über welchen Mechanismus wird dieser potentielle Einfluss vermittelt?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

VLE PRMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Insulin	Biochrom AG, Berlin
DPBS 1x GIBCO 14190	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Trypan blue	Biochrom AG, Berlin
Cisplatin, Etoposid, Docetaxel, Paclitaxel	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Pemetrexed, Gemcitabin	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg,
Killer-TRAIL	Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA
Killer-TRAIL Storage/Solution Buffer	Alexis Biochemiclas, San Diego, CA, USA
Troglitazone #GR210	Biomol Butler Pike, PA, USA
Ciglitazone #GR050	Biomol Butler Pike, PA, USA
15d-PGJ2 #PG050	Biomol Butler Pike, Pa, USA
PPAR-Inhibitor, GW9662	Biomol Butler Pike, PA, USA

2.1.2. Kristallviolettassay

11 % Glutardialdehyd-Lösung

25% Lösung in Wasser
Sigma-Aldrich, St-Louis,
MO, USA

Kristallviolett Crystal-Violet, A.C.S. reagent

Sigma-Aldrich, St-Louis,
MO, USA

10 % Eisessig, Essigsäure 100 %

Merck , Darmstadt

2.1.3. Dapi-Färbung

Mounting Medium for Fluorescence with Dapi

Vectorshield, Vector
Laboratories, Inc.,
Burlingame, CA, USA

2.1.4. Western Blot

6-Aminocaprinsäure

Sigma-Aldrich, St-Louis,
MO, USA

Acrylamid 30 %

Bio-Rad, Hercules, CA,
USA

Albumine Bovine (BSA)

Roth, Karlsruhe

Ammoniumpersulfat (APS)

Merck, Darmstadt

β -Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, St-Louis,
MO, USA

Bromphenolblau

Merck, Darmstadt

DC-Protein-Assay

Bio-Rad, Hercules, CA,
USA

ECL plus Western Blotting Detection System

Amersham, GE Healthcare,
Buckinghamshire, UK

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

Sigma-Aldrich, St-Louis,
MO, USA

Glycerin

Merck, Darmstadt

Glycin

Merck, Darmstadt

Harnstoff (Urea)

Sigma-Aldrich, St-Louis,
MO, USA

Hyperfilm ECL	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver: Blotting Grade Blocker Non-Fat-Dry-Milk	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
NaF	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Novex Tris-Glycin Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Novex Tris-Glycin Running Buffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Precision Plus Protein Dual Color standard	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
PVDF-Membran Hybond-P	Amersham, GE Healthcare Buckinghamshire, UK
TEMED (N,N,N,N_Tetra-methyl-ethylendiamin)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Sodiumdodecylsulfat 20 % (SDS)	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylamniomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Triton X-100,	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Whatman Paper	Whatman, Maidstone, UK

Antikörper

Akt Antibody 9272	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Phospho-Akt (Ser 473) Antibody 9277	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Bad Antibody 9105	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Phospho-Bad (Ser 136) Antibody 9105	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Bcl2 Antibody 2871	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Phospho-Bcl2 Antibody 2872	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
β -Aktin Antibody	Sigma, St- Louis, MO, USA
Caspase 8 (1C12) Antibody 9746	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
DcR1 Antibody AB16509	Chemicon, Billerica, MA, USA
DcR2 Antibody AB 16943	Chemicon, Billerica, MA, USA
DR4 Antibody 06-744	Upstate, Billerica, MA, USA
DR5 Antibody 3696	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody(from donkey)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Fadd Antibody 2782	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Phospho-Fadd (Ser 194) 2781	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

Flip Antibody 3210	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Xiap (3B6) Antibody 2045	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
<u>Lösungen</u>	
4x Sammelpuffer	Tris-Base 0,5 M (pH 6,8), SDS 0,4 %
4x Seperationspuffer	Tris-Base 1,5 M (pH 8,8), SDS 0,4 %
5x Ladepuffer	Tris-Base 312,5 mM (pH 6,8), SDS 10 %,Glycerin 50 %, β -Mercaptoethanol 10 %,Bromphenolblau
Anodenpuffer1	Tris-Base 30 mM, Methanol 20 %
Anodenpuffer 2	Tris-Base 300 mM, Methanol 20 %
Elektrophoresepuffer	Tris-Base 25mM (pH8,3), Glycin 192 mM,SDS 0,1 %
Protein-Lysepuffer	1 mM EDTA, 0,5% Tritonx- 100,5 mM NaF,1 M Urea in PBS, (pH 7,2-7,4)
Kathodenpuffer	Tris-Base 25 mM, 6- Aminocaprönsäure 40 mM, Methanol 20 %
Stripping-Puffer	2 % SDS, 62,5 mM TRIS (pH 6,8) + frisch 0,8 % beta-Mercaptoethanol
TTBS	TBS 1x + Tween-20 0,1 %

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Biosphere Filter Tips Eppendorf/Gilson	Sarstedt, Newton, NC, USA
Combitips plus 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser 22x22 mm	Menzel-Gläser
Falcon 50 ml Polypropylene Conical Tube	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
15 ml Tubes	Sarstedt, Newton, NC, USA
Medium Flasche Filtropur V500.2	Sarstedt, Newton, NC USA
Pasteurpipetten 230 mm	Assistent, Sondheim
Serological Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Newton, NC USA
Tissue Culture Flask 25 cm ² /75 cm ²	Sarstedt, Newton, NC, USA
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt, Newton, NC, USA
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt, Newton, NC, USA
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt, Newton, NC, USA

2.1.6. Geräte

Zählkammer	Neubauer
Standzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	ThermoFisherScientific Waltham, USA
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena
Floureszenzmikroskop	Axioplan 2, von Zeiss
Sunrise Absorbance Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
pH-Meter	Knick, Meiringen
Pinzetten	Zwilling, Solingen
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waage	Sartorius, Göttingen
Messzylinder 100, 1000 ml	Assistent, Sondheim
Elektrophoresekammer Hoefer mini VE	Amersham, New York USA
Elektrophoresekammer Novex Mini-cell	Invitrogen, Carlsbad,, USA
Spannungsquelle Pharmacia Biotech	Amersham, New York USA
Blotter	Hoefer SemiPhor, San Francisco, USA
Entwicklungsgerät	Kodak GmbH, Stuttgart

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Für alle Arbeitsschritte mit Zellkulturen wurden ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien genutzt und alle Arbeiten unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Für sämtliche Untersuchungen wurde die Chemotherapeutika- und TRAIL-sensitive Ovarialkarzinom-Zelllinie HEY verwendet, welche ursprünglich aus Aszites eines seröspapillären Ovarialkarzinoms kultiviert worden ist.

Zusätzlich wurden HEY-Zelllinien mit selektiver Zytostatikaresistenz gegen die beim Ovarialkarzinom eingesetzten Medikamente (Cisplatin, Etoposid, Docetaxel, Paclitaxel (Meinhold et al., 2005), Pemetrexed und Gemzitabin (Bräutigam et al., 2009) und eine gegen TRAIL-resistente Kontrollzelllinie eingesetzt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in VLE RPMI 1640 Medium, welchem 10 % fetales Kälberserum und 10000 U Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurde, bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank in 75 cm² Gewebekulturflaschen kultiviert.

Zur Langzeiterhaltung der spezifischen Zytostatika-Resistenz wurde dem RPMI-Kulturmedium die jeweilige Substanz zugesetzt (2 µg/ml Cisplatin, 5 µg/ml Etoposid, 20 nM Docetaxel, 50 nM Paclitaxel, 5 µM Gemzitabin, 3 µM Pemetrexed, 20 ng/ml TRAIL)

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, erfolgte ab einer Konfluenz von circa 80 % die Passagierung.

Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 7 ml PBS gewaschen und mittels Überschichtung mit 3 ml Trypsin/EDTA für 10 Minuten bei 37 °C abgelöst.

Die Reaktion wurde mit 7 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Röhrchen pipettiert und 10 Minuten bei 1350 U/min zentrifugiert.

Nach Resuspension der sedimentierten Zellen in 5-10 ml Medium erfolgte die Wiederaussaat in geringerer Konzentration, bzw. wurde für nachfolgende Versuche die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer mittels der Trypanblaumethode bestimmt.

2.2.2. Proliferationsstudien

2.2.2.1. Zellstimulation mit TRAIL

Zunächst sollte ein Effekt auf die Zellproliferation durch TRAIL-Stimulation untersucht werden.

2.2.3. Kristallviolett-Assay

Der Kristallviolettassay ist ein Zellkulturtest, welcher die antiproliferative Wirkung, hier von TRAIL und den PPAR γ -Liganden, über die veränderte Zellmasse, die der Zellmenge proportional ist, bestimmt.

Zur Auswertung der in 2.2.2. beschriebenen 96-well Platten wurde nach vollendeter Inkubationszeit zunächst das Kulturmedium abgesogen und die adhärennten Zellen mit 50 μ l/well Glutardialdehyd (11 %ig) für 20 Minuten unter leichtem Schütteln fixiert.

Danach folgte ein Waschen der Platten mit je 1 l Leitungswasser und ein gründliches Ausklopfen der Platten auf Zellstoff. Tote Zellen hafteten nicht mehr am Boden und wurden somit entfernt.

Nach 20-minütigem Trocknen wurden 100 μ l einer 0,1 %igen Kristallviolettlösung (pH 4,5) auf die 96 well Platten pipettiert.

Kristallviolett ist ein violetter Farbstoff, der die DNA-assoziierten Nukleoproteine anfärbt.

Der überschüssige Farbstoff wurde mit Leitungswasser herausgewaschen, die Platten gründlich auf Zellstoff ausgeklopft und wieder für 20 Minuten getrocknet.

Der in den Zellen verbliebende Farbstoff wurde mit 100 μ l/well 10 %igem Eisessig unter 5-minütigem Schütteln herausgelöst und die optische Dichte in den einzelnen wells mittels eines Plattenreaders photometrisch bei 590 nm gemessen.

Die graphische Auswertung erfolgte mit Microsoft-Excel.

2.2.4. Dapi-Färbung

Um nachzuweisen, dass TRAIL bzw. die Kombinationsbehandlung mit den PPAR γ -Liganden in den Zellen Apoptose hervorruft, wurde eine Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI durchgeführt.

DAPI lagert sich in die DNA ein und dieser gebildete DNA-DAPI-Komplex leuchtet hellblau, wenn er mit sichtbarem Licht der Wellenlänge von 365 nm angeregt wird. Dadurch kann die Morphologie der Zellkerne mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden.

Zellkerne gelten als noch intakt, wenn sie rund und homogen leuchten, apoptotische Kerne zeigen kondensiertes Chromatin an der peripheren Kernmembran oder bereits eine fragmentierte Morphologie, gekennzeichnet durch die so genannte Blasenbildung und die Bildung apoptotischer Körperchen.

2.2.5. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei welchem Proteine ihrer Größe nach über eine Acrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt werden und über eine Antikörper-gekoppelte Reaktion spezifisch nachweisbar sind.

Da Proteine negative Ladungen besitzen, können sie im elektrischen Feld wandern und ihre zurückgelegte Strecke ist hierbei umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht.

Sobald die Proteine aufgetrennt sind, werden sie durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegtem elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran übertragen.

Im weiteren Versuchsablauf binden spezifische Primärantikörper an die gesuchten Proteine.

Wenn an das Fc-Fragment des Antigen-Antikörper-Komplexes ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper gebunden hat, kann das gesuchte Protein über Chemilumineszenz detektiert werden.

Hierzu wird das in dem ECL Western Blot-Detektionsdetergens enthaltene Luminol durch die Peroxidase oxidiert. Die Lichtemission kann mit einem für diese Wellenlänge sensitiven Röntgenfilm detektiert werden.

Die gesuchten Proteine stellen sich als schwarze Banden dar, dessen Stärke proportional zur Lichtemission ist. Sie sind umso stärker, je stärker die Proteinexpression ist. Die Größe der Proteine ist anhand einer standardisierten Leiter bestimmbar.

2.2.5.1. Zellstimulation für Protein-Expressionsanalysen

Vor der eigentlichen Extraktion der Proteine wurden die Ovarialkarzinomzellen sowohl einer Inkubation mit TRAIL alleine, als auch einer Kombinationsbehandlung mit den PPAR γ -Liganden unterzogen. Zur Bestimmung der optimalen TRAIL-Konzentration und Inkubationsdauer wurden verschiedenen Versuchsreihen zunächst nur an der parentalen HEY-Zelllinie und den TRAIL-resistenten Zellen durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen einer 80 % konfluenten 75 cm² Gewebekulturflasche trypsiniert, 2-5 x 10⁶ Zellen pro 10 ml Kulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert.

Am nächsten Tag erfolgte dann, wie in Tabelle 5 abgebildet, die Stimulation der Zellen.

Tabelle 5: Übersicht verschiedener Versuchsreihen der TRAIL-Stimulation

TRAIL-Konzentrationen in ng/ml	Inkubationsdauer
20 ng/ml	0-Kontrolle 30 und 60 Minuten 24 Stunden
50 ng/ml	0-Kontrolle 4 Stunden 6 Stunden 12 Stunden 18 Stunden 24 Stunden
100 ng/ml	0-Kontrolle 30 und 60 Minuten 4 Stunden 24 Stunden

Für die folgenden Versuche wurden alle acht Zelllinien mit 50 ng/ml TRAIL über 18 Stunden behandelt

Um einen Einfluss der PPAR γ -Liganden zusätzlich zu TRAIL auf die Proteinexpression nachzuweisen, wurde an der parentalen HEY-Zelllinie und den TRAIL-resistenten Zellen eine Kombinationsbehandlung durchgeführt, und zwar nach den folgenden Konzentrationen und Inkubationzeiten:

Tabelle 6: Übersicht zur Kombinationsbehandlung der TRAIL und PPAR γ -Konzentrationen

TRAIL- und PPARγ-Konzentrationen	Inkubationsdauer
50 ng/ml TRAIL	6, 12 und 18 Stunden
50 ng/ml TRAIL + 20 μ M Ciglitazone	6, 12 und 18 Stunden
50 ng/ml TRAIL + 20 μ M Troglitazone	6, 12 und 18 Stunden

Zum Vergleich dienten unstimulierte Zellen.

2.2.5.2. Herstellung von Gesamtproteinlysat

Nach Vollendung der Inkubationszeit wurden die Zellen in den Petrischalen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Hilfe eines Gummischabers geerntet. Es folgte ein sofortiges pelletieren der Proben für fünf Minuten bei 4500 UpM (Umdrehungen pro Minute) und 4°C.

Das entstandene Zellpellet wurde je nach Größe in 80-100 µl gekühltem Protein-Lysepuffer mit 1 % 100x Phosphatase-Inhibitor und 1 % 100x Proteaseinhibitor resuspendiert, 3-mal für 15 Sekunden gevortext und dann für 60 Minuten auf Eis inkubiert.

Zum abtrennen der Zelltrümmer folgte ein 15-minütiges Zentrifugieren bei 12000 UpM und 4 °C, wodurch sich nun die denaturierten Proteine im Überstand befanden und zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurden. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford mit dem DC-Protein Assay, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, bestimmt.

Für Langzeitlagerungen wurden die Proteinlösungen bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese, dazu wurden die Proben in einem Sammelgel (pH 6,8 %, 3 % Acrylamid, s. Tab. 8) fokussiert und anschließend in einem Trenngel mit geeigneter Zusammensetzung (pH 8,8, 7,5 – 15 % Acrylamid) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (s. Tab. 7).

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung des Trenngels, je nach Größe des Zielproteins variierten die Mengen der Gelkomponenten:

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenngels

Proteingröße (kDa)	50-200	30-120	20-100	10-60
Acrylamid	7,50%	10 %	12 %	15 %
A. bidest (ml)	5	4,15	3,5	2,5
4x Trennpuffer	2,5	2,5	2,5	2,5
(Bis-)Acrylamid 30 % (ml)	2,5	3,35	4	5
TEMED (µl)	10	10	10	10
10% APS (µl)	100	100	100	100

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels

Acrylamid	3 %
A. bidest (ml)	1,95
4x Sammelpuffer (ml)	0,75
(Bis-)Acrylamid 30 % (ml)	0,3
TEMED (μ l)	5
10% APS (μ l)	50

Während der Polymerisation der Gelkomponenten, erfolgte die Equilibrierung der Proteinproben mit Aqua bidest auf 20 μ g pro Ansatz, dem Zusatz von 5x SDS-Ladepuffer, und das 3-minütige Kochen aller Proben, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen zu unterbrechen, anschließend wurden sie wieder auf Eis gelagert.

Zusammen mit 5 μ l eines Proteingrößenmarkers wurden die Proben auf das Sammelgel aufgetragen und innerhalb von 30 Minuten bei 300 V, 15 mA/Gel und 100 W gesammelt.

In weiteren 1,5-2 Stunden, je nach Prozentgehalt des Gels und Größe des gesuchten Proteins, wurden die Proteine bei 300 V, 30 mA/Gel und 100 W im unteren Gel aufgetrennt.

2.2.5.4. Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western Blot)

Für die folgende Immundetektion durch Antikörper wurde das fertige Gel zusammen mit drei in Katodenpuffer getränktem Filterpapieren, einer in Methanol für 10 Sekunden aktivierten PVDF-Membran und jeweils drei in Anodendepuffer 1 und drei in Anodendepuffer 2 getränkten Filterpapieren, zu einem blasenfreien „Blot-Sandwich“ vervollständigt.

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 55 Minuten bei 300 V, 100 W und 45 mA/Gel.

Die fertige Membran wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 60 Minuten lang bei Raumtemperatur, mit 25 ml 5 %igem BSA gelöst in TTBS, unter Bewegung inkubiert, um freie unspezifischen Bindungen zu blockieren.

Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmixer.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Verdünnungen der genutzten Primärantikörper:

Tabelle 9: Übersicht über die Verdünnungen der genutzten Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	gelöst in
Akt (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TTBS
Phospho-Akt (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TTBS
Bad (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Phospho-Bad (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Bcl2 (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Phospho-Bcl2 (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Caspase8 (Maus)	1:1000	5 % BSA in TTBS
DcR1 (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
DcR2 (Kaninchen)	1:2000	5 % BSA in TTBS
DR4 (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
DR5 (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Fadd (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Phospho-Fadd (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Flip (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
Xiap (Kaninchen)	1:500	5 % BSA in TTBS
β-Aktin (Maus)	1:2000	5 % MMP in TTBS

Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x in TTBS gewaschen und mit dem 1:2000 verdünnten in 5 %igem MMP angesetzten Sekundärantikörper für 60 Minuten bei RT rollend inkubiert.

Um unspezifische Hintergrundfärbungen gering zu halten wurde die Membran vor dem Entwickeln 3 x für 30 Minuten in TTBS bei RT gewaschen, um sie dann für 3 Minuten mit dem frisch angesetzten ECL-Reagenz zu überschichten. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt, in einer Röntgenkassette zur Dunkelkammer transportiert, und die speziellen Röntgenfilme für 30 sec - 20 min belichtet, um sie dann maschinell entwickeln zu lassen.

Um auf derselben Membran noch weitere Antikörper testen zu können, oder um die Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen und den gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, konnten die gebundene Antikörper durch „Strippen“ von der Membran entfernt werden und diese bis zu dreimal zur wiederholten Immundetektion genutzt werden.

Für diesen Vorgang wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten bei 55 °C in 50 ml Stripping-Puffer inkubiert, 3 x für 15 Minuten in TTBS gewaschen, eine Stunde in 5 %igem BSA oder 5 % MMP blockiert, um dann den Inkubationsprozess mit Antikörpern, die entweder gegen die unphosphorierte Form des Zielproteins oder gegen ein gut charakterisiertes house-keeping-Gen (β-Actin) gerichtet waren, zu wiederholen.

3. Ergebnisse

3.1. Effekt der TRAIL-Behandlung

3.1.1. Proliferationshemmung durch TRAIL-Behandlung

Die parentale Ovarialkarzinom-Zelllinie HEY, die sechs chemoresistenten Zelllinien und die gegen TRAIL-resistente Kontrollzelllinie wurden für 48 Stunden mit aufsteigenden TRAIL-Konzentrationen (0, 1, 2, 5 und 10 ng/ml) behandelt und die Wachstumshemmung mittels nachfolgendem Proliferationsassay untersucht.

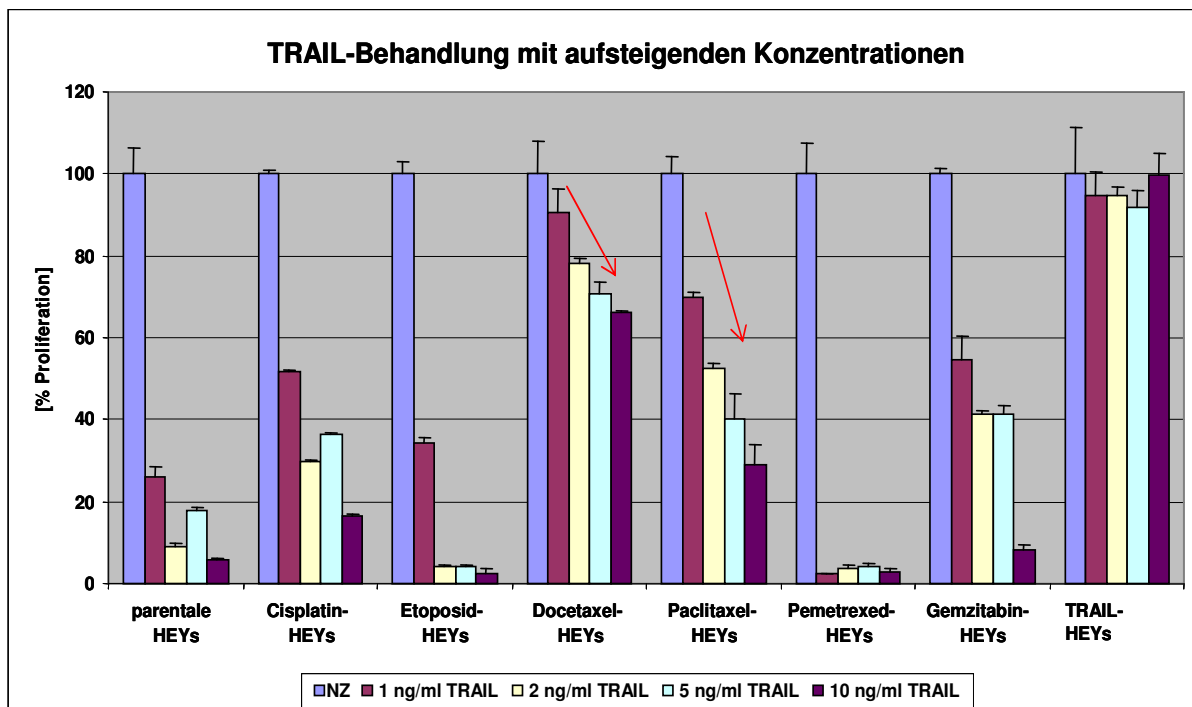


Abbildung 5: Proliferationsassay der parentalen Zelllinie HEY, der sechs chemoresistenten Zelllinien und der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie TRAIL. Die Zellen wurden mit aufsteigenden TRAIL-Konzentrationen für 48 Stunden behandelt und die Wachstumshemmung unter Verwendung des Kristall-Violett-Tests (s. Methoden) bestimmt.

Aus dem Säulendiagramm in Abbildung 5 geht das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf TRAIL hervor, wobei sowohl in allen chemoresistenten Zelllinien, als auch in der parentalen Zelllinie HEY eine Dosis-abhängige Proliferationshemmung beobachtet werden konnte.

Die Etoposid- und Pemetrexed-resistenten Varianten zeigten ein der parentalen Zelllinie HEY ähnliches Ansprechen, die Taxan-, Cisplatin- und Gemzitabin-resistenten Zellen wiesen eine partielle TRAIL-Resistenz auf, welche bei den Taxan-resistenten Varianten am ausgeprägtesten war (siehe Pfeile). Die Proliferation der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie wurde von TRAIL-Konzentrationen bis einschließlich 10 ng/ml nicht beeinflusst.

3.1.2. Apoptoseinduktion durch TRAIL-Behandlung

Um nachzuweisen, dass TRAIL Apoptose in den Zellen hervorruft, wurden die parentale Zelllinie HEY, die sechs chemoresistenten Zelllinien und die gegen TRAIL-resistente Kontrollzelllinie mit steigenden TRAIL-Konzentrationen (0, 10 und 50 ng/ml) behandelt und eine Färbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff DAPI durchgeführt.

Es wurden pro Zelllinie hundert Kerne ausgezählt und deren Morphologie fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Runde, vollständige Kerne wurden hierbei als intakt, nicht-apoptotisch angenommen, während kondensiertes Chromatin und fragmentierte Nuclei als apoptotisch gewertet wurden. Unstimulierte Zellen aller untersuchten Linien zeigten sich im Fluoreszenzmikroskop rund und homogen leuchtend (s. Abb.6, Photo links), wohingegen mit steigenden TRAIL-Konzentrationen verstärkt apoptotische Kerne (s. Abb. 6, Photo Mitte und rechts) beobachtet wurden. Die Zellen zeigten hier ein ähnliches Ansprechen auf TRAIL wie zuvor im Proliferationsassay: Die parentale (blau), Pemetrexed- (braun), Etoposid- (gelb), Cisplatin- (orange) und Gemzitabin-resistente (grün) Zelllinie wiesen eine höhere Anzahl apoptotischer Kerne, und somit eine stärkere Sensitivität für TRAIL, als die Taxan-resistenten Zellen (hell-blau, lila) auf.

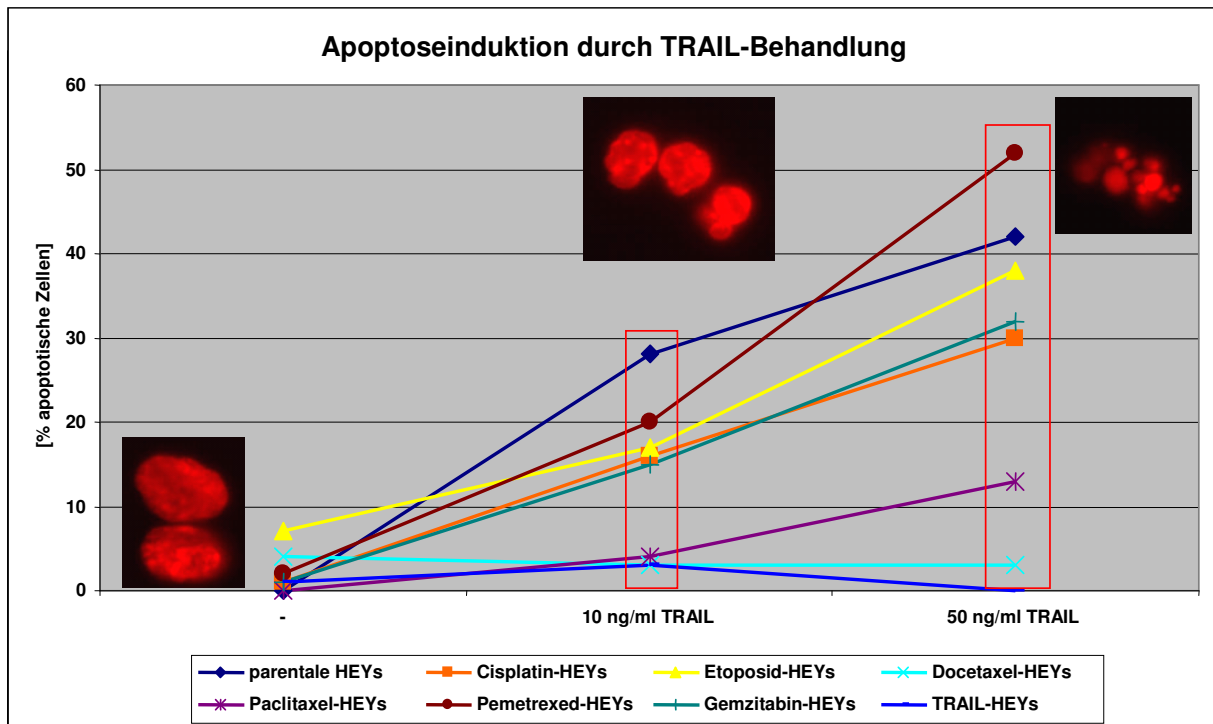


Abbildung 6: Bestimmung der Apoptoseinduktion durch TRAIL anhand von DAPI-Färbung (s. Methoden). Photo 1 (links) zeigt die unstimulierten, noch intakten Zellkerne, welche rund und homogen leuchten. Photo 2 und 3 (Mitte/rechts) zeigen apoptotische Kerne, deren kondensiertes Chromatin sich an der peripheren Kernmembran befindet, und die sich mit einer fragmentierten Morphologie präsentieren, gekennzeichnet durch die Bildung von Blasen und apoptotischer Körperchen. Während TRAIL-Konzentrationen von 50 ng/ml deutlich Apoptose in den übrigen Zelllinien hervorruft, zeigen die Taxan-resistenten Zellen wiederum eine partielle TRAIL-Resistenz.

3.1.3. Detektion der Proteinexpression der Schlüsselfaktoren des TRAIL-Signalweges

3.1.3.1. Detektion der Proteinexpression in unbehandelten Zellen

Die folgenden Ergebnisse stellen die Proteinexpression der vier TRAIL-Rezeptoren (Abb. 7), der antiapoptotischen (Abb. 8) und der proapoptotischen Faktoren (Abb. 9) in allen Zelllinien ohne TRAIL-Behandlung dar.

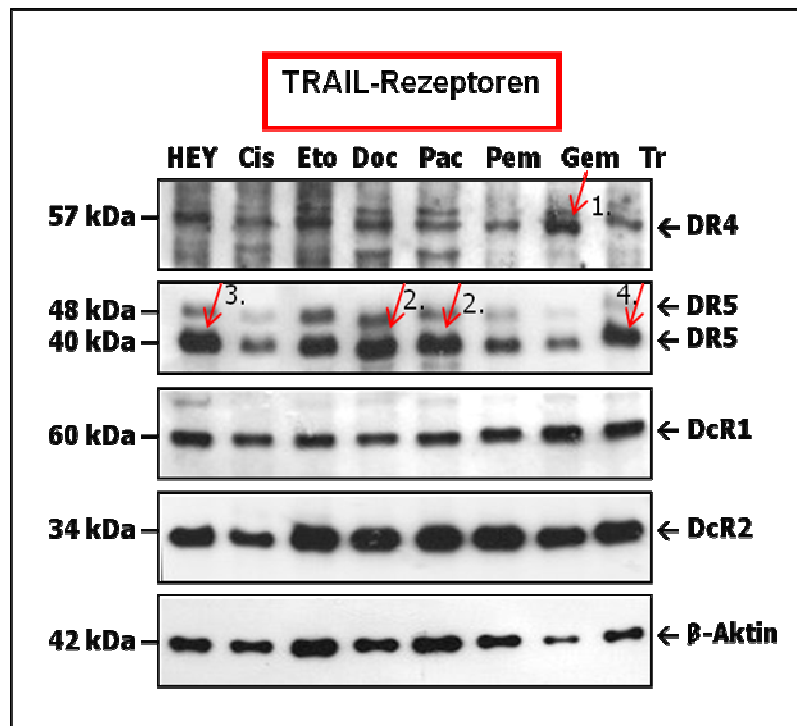


Abbildung 7: Western Blot-Untersuchung der 4 TRAIL-Rezeptoren DR4, DR5, DcR1 und DcR2 in unbehandelten HEY-Zelllinien. HEY = parentale HEY Zelllinie, Cis = Cisplatin-resistente Zelllinie; Eto = Etoposid-resistente, Doc = Docetaxel-resistente, Pac = Paclitaxel-resistente, Pem = Pemetrexed-resistente, Gem = Gemzitabin-resistente und Tr = TRAIL-resistente HEY Zelllinie.

In allen untersuchten Zelllinien konnte die Expression der vier TRAIL-Rezeptoren nachgewiesen werden. Während sich in der Expressionsanalyse der „Decoy“-Rezeptoren DcR1 und 2 keine spezifischen Unterschiede in der parentalen Zelllinie HEY, den sechs chemoresistenten Zelllinien und in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie ergaben, zeigten DR4 und 5 verschiedene Expressionsmuster: Eine starke Expression von DR4 konnte in der Gemzitabin-resistenten Zelllinie nachgewiesen werden (siehe roter Pfeil 1.), während DR5 v. a. in den Taxan-resistenten (rote Pfeile 2.), aber auch in den parentalen und TRAIL-resistenten Zellen verstärkt exprimiert wurde (roter Pfeil 3. und 4.).

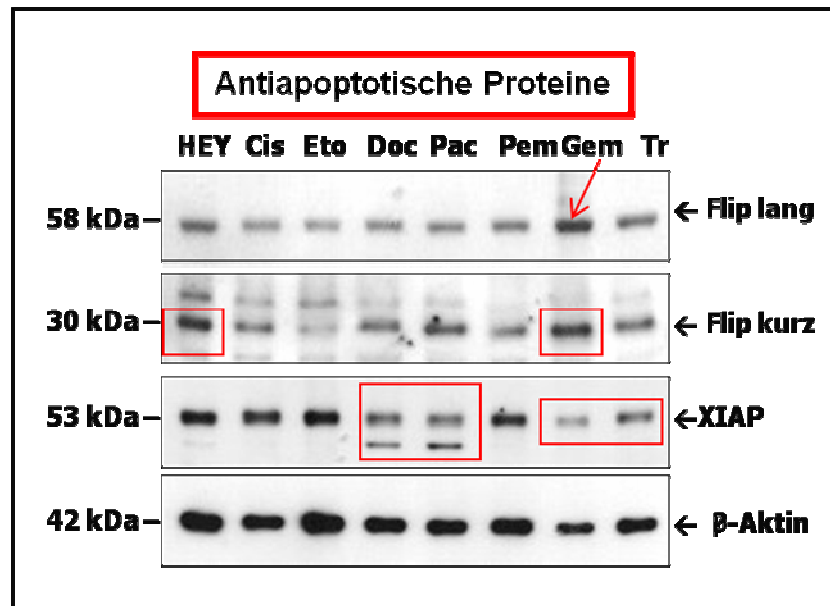


Abbildung 8: Western Blot-Untersuchung antiapoptotischer Proteine des TRAIL-Signalweges – c-FLIP und XIAP - in unbehandelten HEY-Zelllinien. HEY = parentale HEY Zelllinie, Cis = Cisplatin-resistente Zelllinie; Eto = Etoposid- resistente Zelllinie, Doc = Docetaxel resistente Zelllinie, Pac = Paclitaxel-resistente Zelllinie, Pem = Pemetrexed-resistente Zelllinie, Gem = Gemzitabin-resistente Zelllinie, Tr = TRAIL-resistente HEY Zelllinie.

Während cFlip_{lang} in den Gemzitabin-resistenten Zellen am stärksten exprimiert war (siehe roter Pfeil), konnte eine vermehrte Expression der kurzen Spleiß-Variante des antiapoptotischen Proteins cFlip wiederum in der Gemzitabin-resistenten , aber auch in der parentalen HEY-Zelllinie (siehe roter Kasten) beobachtet werden.

Das antiapoptotische Protein XIAP wies in den partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Zelllinien, der Gemzitabin-resistenten Zelllinie sowie in der Kontrollzelllinie (siehe roter Kasten) eine im Gegensatz zur parentalen Zelllinie HEY und der Cisplatin- und Etoposid-resistenten Zelllinie verminderte Expression auf.

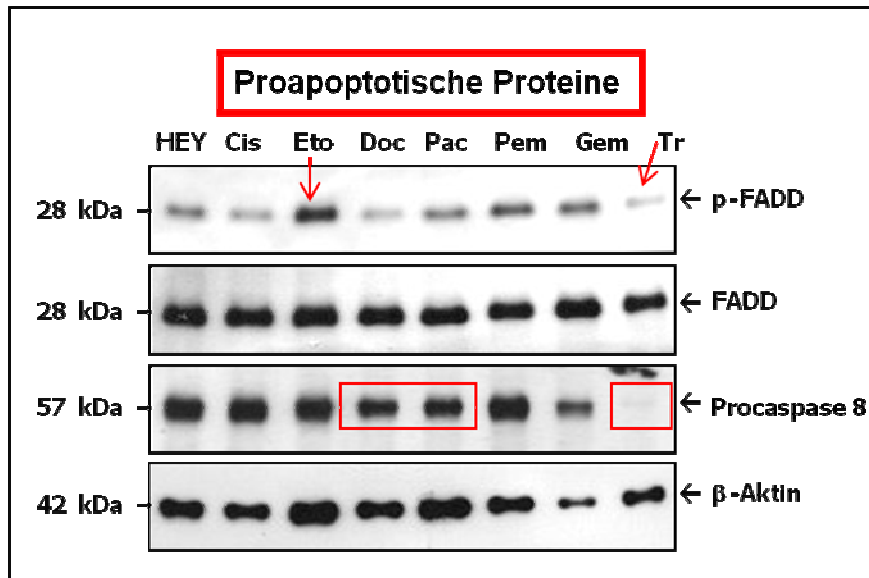


Abbildung 9: Western Blot-Untersuchung proapoptischer Proteine des TRAIL-Signalweges – FADD und Caspase-8 - in unbehandelten HEY-Zelllinien. HEY = parentale HEY Zelllinie, Cis = Cisplatin-resistente Zelllinie; Eto = Etoposid-resistente Zelllinie, Doc = Docetaxel resistente Zelllinie, Pac = Paclitaxel-resistente Zelllinie, Pem = Pemetrexed-resistente Zelllinie, Gem = Gemcitabin-resistente Zelllinie, Tr = TRAIL-resistente HEY Zelllinie.

Das proapoptische Protein FADD wies eine nahezu identische Expression in allen 8 untersuchten Zelllinien auf, wohingegen die phosphorylierte, aktivierte Form von FADD sehr unterschiedlich exprimiert wurde: stark in der Etoposid-, schwach in der TRAIL-resistenten Linie (siehe Pfeile). Procaspase 8 zeigte eine verminderte Expression in den Taxan-resistenten Zellen und war in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie nicht nachweisbar (siehe roter Kasten).

3.1.3.2. Detektion der Proteinexpression in TRAIL-behandelten Zellen

Für die nachfolgenden Behandlungsversuche (Abb. 10, 11 und 12) mit TRAIL wurden unterschiedliche Konzentrationen über verschiedene Zeiträume getestet. Die aussagekräftigsten Ergebnisse zur Analyse der Proteinexpression (unter TRAIL-Behandlung), konnten nach einer Behandlung aller Zelllinien mit 50 ng/ml TRAIL für 18 Stunden erzielt werden.

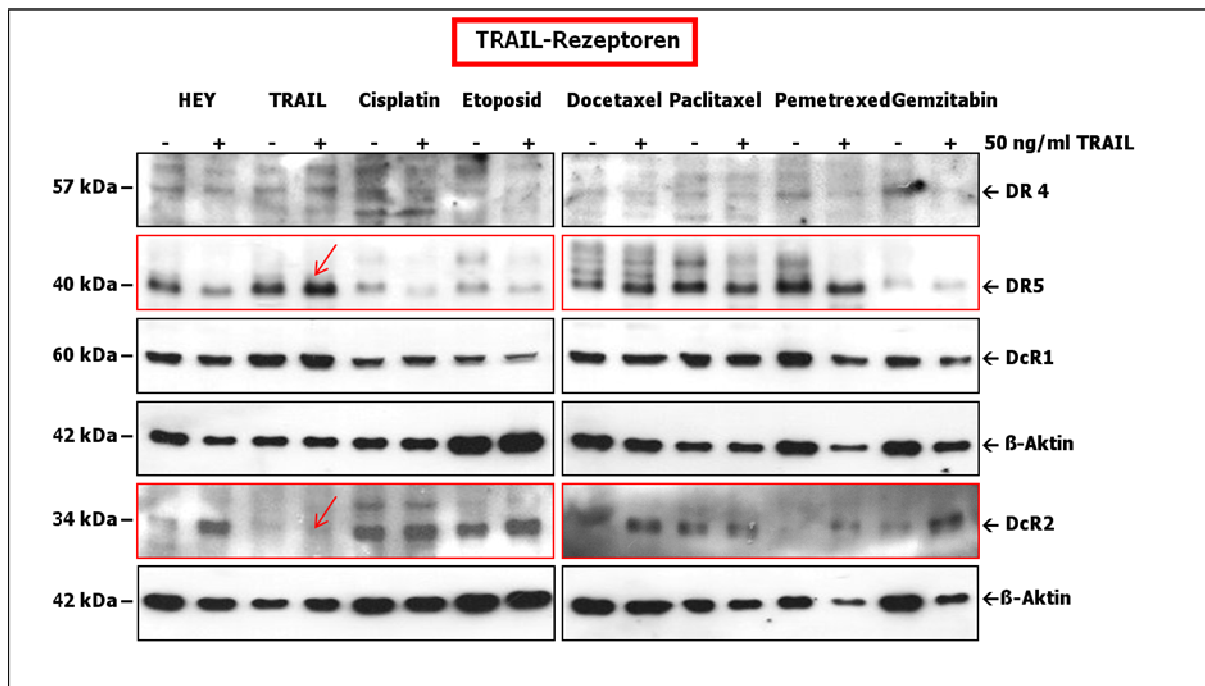


Abbildung 10: Western Blot-Untersuchung der TRAIL-Rezeptoren nach Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL für 18 Stunden. Die Abbildung zeigt, dass DR5 und DcR3 durch TRAIL reguliert werden.

Der Todesrezeptor vier (DR4) und der „Decoy“-Rezeptor eins (DcR1) konnten in der parentalen, den sechs chemoresistenten und der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie nachgewiesen werden, wobei DR4 sehr schwach und DcR1 wesentlich deutlicher exprimiert war. Beide Rezeptoren wiesen jedoch nach Behandlung keine Regulation auf.

Allerdings ließ sich eine verminderte Expression des DR5-Rezeptors und eine verstärkte Expression des DcR2-Rezeptors nach TRAIL-Behandlung in allen Zelllinien mit Ausnahme der TRAIL-resistenten Variante nachweisen (siehe Pfeile in roten Kästen).

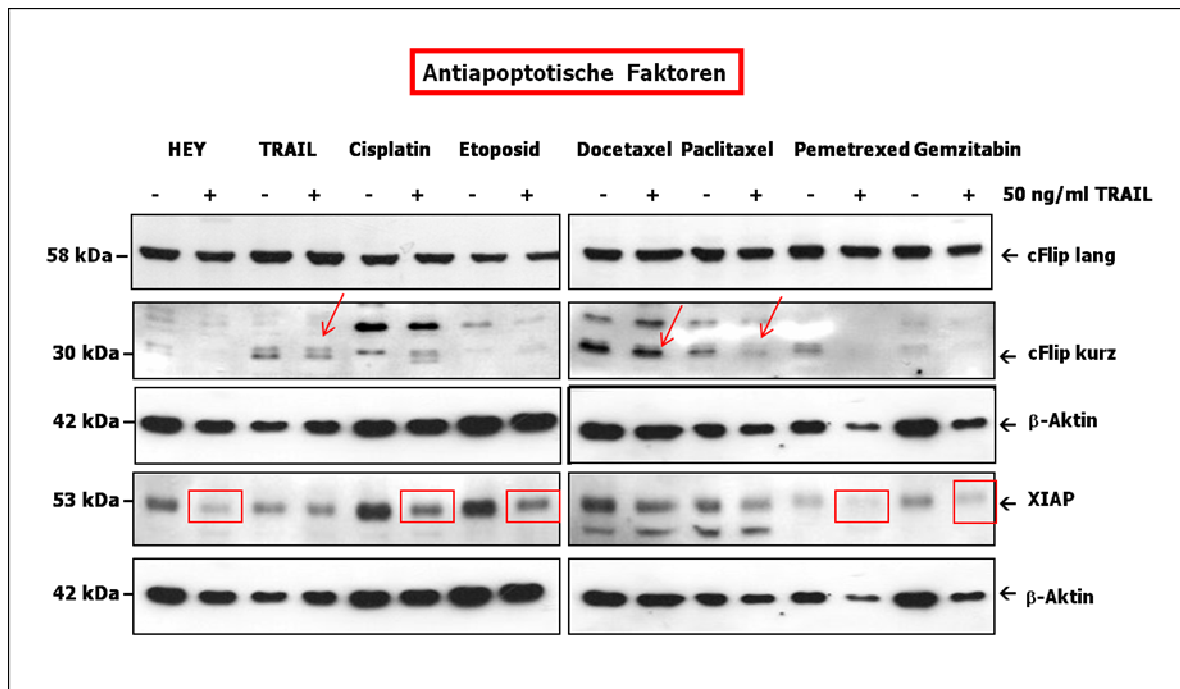


Abbildung 11: Western Blot-Untersuchung der antiapoptotischen Proteine nach 50 ng/ml TRAIL für 18 Stunden. Die Expression von XIAP war nach Behandlung in den sensitiven Zelllinien vermindert. Eine Herabregulation von cFlip_{kurz} nach Behandlung blieb sowohl in der Kontrollzelllinie, als auch in den Taxan-resistenten und Cisplatin-resistenten Varianten aus.

Die Western Blot-Analyse der antiapoptotischen Faktoren zeigte, dass nach TRAIL-Behandlung die kurze Spleißvariante von cFlip in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie und in der partiell TRAIL-resistenten Docetaxel-resistenten Zelllinie stärker exprimiert war (siehe roter Pfeil) als in den übrigen Zelllinien.

Die lange Spleißvariante wies weder in den unstimulierten, noch in den stimulierten Zellen eine eindeutige Regulation auf.

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Expression und dem Ansprechen der Zellen auf eine TRAIL-Behandlung konnte für das antiapoptotische Protein XIAP nachgewiesen werden. In der sensitiven parentalen Zelllinie HEY erfolgte eine geringere XIAP-Expression unter TRAIL-Behandlung. Ein vergleichbares Ansprechen zeigten die Cisplatin-, Etoposid-, Pemetrexed- und Gemzitabin-resistenten Zelllinien (siehe rote Kästen), wohingegen in den Taxan-resistenten Zelllinien eine nur sehr geringe und in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie keine Abnahme der XIAP-Expression nachgewiesen werden konnte.

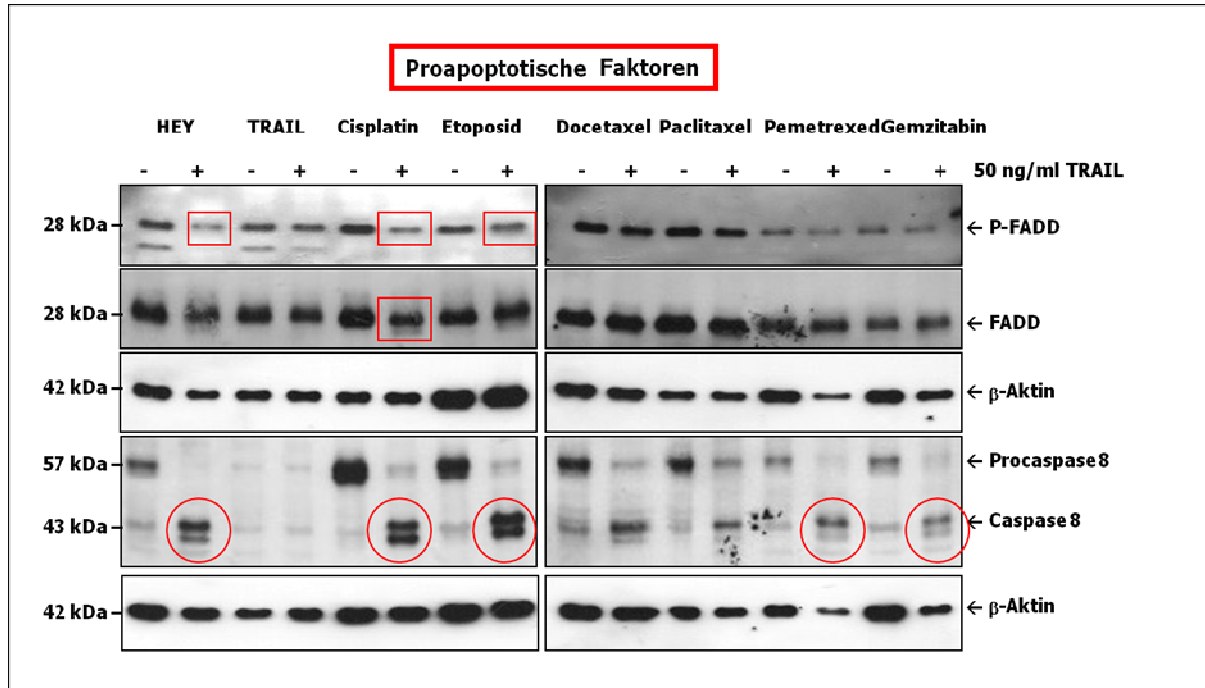


Abbildung 12: Western Blot-Untersuchungen der proapoptotischen Faktoren Caspase 8 und FADD nach 18-stündiger Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL. Die TRAIL-sensitiven Zelllinien zeigen eine verstärkte Regulation der Proteinexpression gegenüber den partiell TRAIL-resistenten Linien.

In den Western Blot-Untersuchungen wurde der Effekt durch die TRAIL-Behandlung auf die proapoptotischen Proteine FADD und Caspase 8 untersucht. Die Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL führte in den sensitive Zelllinien (parentale HEY, Cisplatin-, Etoposid-, Pemetrexed- und Gemcitabin-resistenten HEY Zelllinien) zu einer Spaltung der inaktiven Procaspase 8 in ihre aktive, proapoptotische Form (siehe rote Kreise), welche in den Taxan-resistenten Zelllinien nur unvollständig stattfand. In der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie wurde Caspase 8 nicht exprimiert.

Durch die lang anhaltende TRAIL-Behandlung zeigte sich in allen Zelllinien außer in der TRAIL-resistenten Variante eine Regulation der Expression von p-FADD.

3.2. Effekt der Kombinationsbehandlung mit PPAR γ -Liganden

3.2.1. Proliferationshemmung unter Kombinationsbehandlung

Die folgenden drei Abbildungen (Abb. 13-15) zeigen die Effekte der Kombinationsbehandlungen aus 1 ng/ml TRAIL und 50 μ M Ciglitazone (Abb. 13), 50 μ M Troglitazone (Abb. 14) und 5 μ M PGJ₂ (Abb. 15) nach 48-stündiger Inkubation.

In den Abbildungen verdeutlichen die jeweils ersten Balken (dunkelblau) eines jeden Quartetts die Proliferation der unbehandelten Zellen, die zweiten (bordeaux) die unter alleiniger TRAIL-Behandlung, die dritten (gelben) das Wachstum unter PPAR γ -Liganden-Behandlung, während mit den vierten (türkisen) Balken die Effekte der Kombinationsbehandlung dargestellt sind.

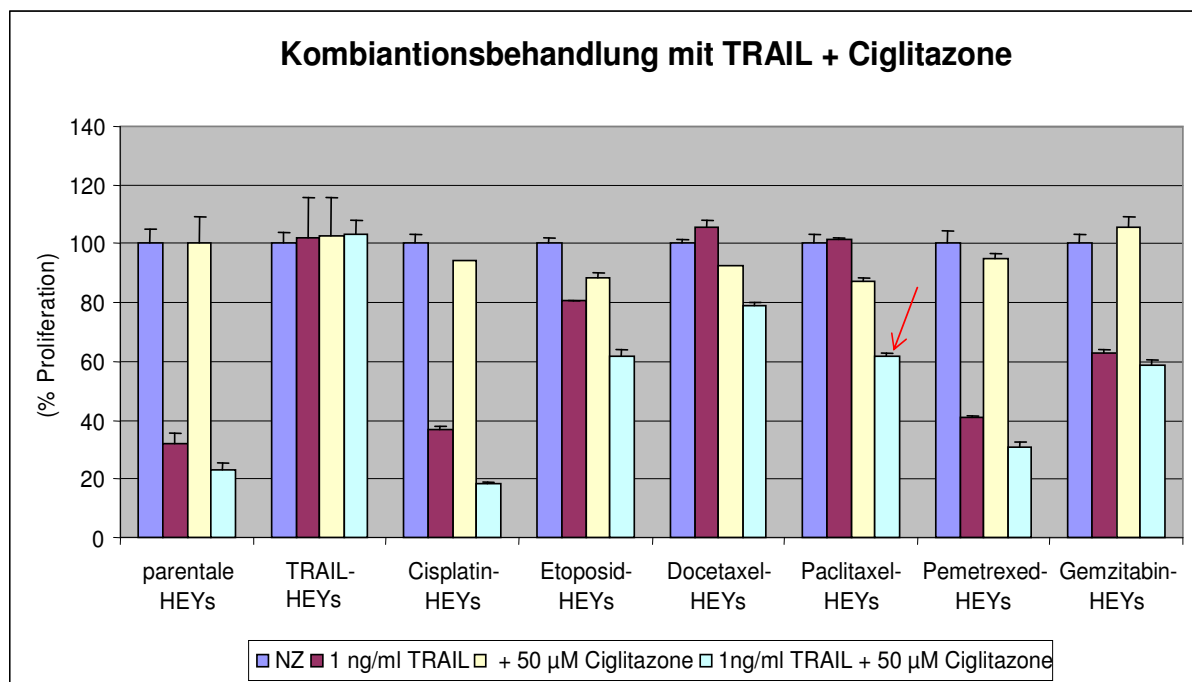


Abbildung 13: Kombinationsbehandlung mit TRAIL und Ciglitazone über einen Zeitraum von 48 Stunden. Während die alleinige Behandlung mit 50 μ M Ciglitazone (gelb) keinen oder nur einen geringen Effekt erzielte, zeigte die Kombination aus 1 ng/ml TRAIL und 50 μ M Ciglitazone im Vergleich zur alleinigen TRAIL-Behandlung (1 ng/ml, bordeaux) einen synergistischen Effekt auf die Proliferation aller untersuchten Zelllinien (türkis) mit Ausnahme der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie.

Zunächst geht aus der Abbildung hervor, dass die Proliferation der untersuchten Zelllinien durch eine TRAIL-Konzentration von 1 ng/ml erwartungsgemäß nur teilweise beeinflusst

wurde, so zeigte sich z.B. wiederum eine partielle TRAIL-Resistenz in den Taxan-resistenten Zelllinien.

Die Behandlung mit 50 µM Ciglitazone erzielte keinen oder nur leicht hemmenden Effekt auf die Zelllinien, wohingegen die Kombination aus TRAIL und Ciglitazone in allen Varianten - auch in den partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Zellen - einen synergistischen Effekt auf die Proliferation ausübte. Besonders deutlich konnte dieser Effekt in der Paclitaxel-resistenten Zelllinie nachgewiesen werden (siehe roter Pfeil). Es zeigte sich kein Effekt auf die TRAIL-resistente Variante.

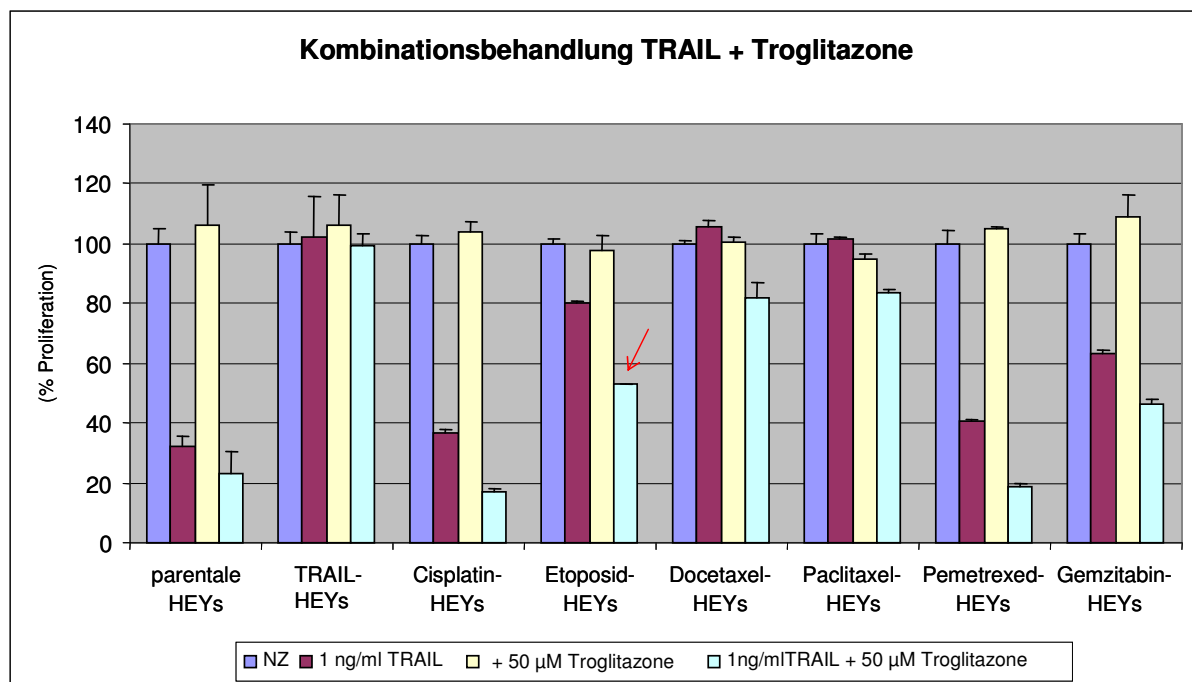


Abbildung 14: Kombinationsbehandlung mit TRAIL und Troglitazone für 48 Stunden. Während die alleinige Behandlung mit 50 µM Troglitazone (gelb) keinen oder nur einen geringen Effekt erzielte, zeigte die Kombination aus 1 ng/ml TRAIL und 50 µM Troglitazone im Vergleich zur alleinigen TRAIL-Behandlung (1 ng/ml, bordeaux) einen synergistischen Effekt auf die Proliferation aller untersuchten Zelllinien (türkis) mit Ausnahme der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie.

Die alleinige TRAIL-Behandlung zeigte eine identische Wirkung wie in der vorangegangenen Untersuchung: die Proliferation der acht untersuchten Zelllinien wurde durch eine TRAIL-Konzentration von 1 ng/ml wieder nur teilweise beeinflusst und die Taxan-resistenten Zelllinien wiesen eine partielle TRAIL-Resistenz auf.

Die Behandlung mit 50 µM Troglitazone erbrachte keinen hemmenden Effekt auf die Zelllinien, wohingegen die Kombination aus TRAIL und Troglitazone besonders in der Etoposid-resistenten Zelllinie den stärksten synergistischen Effekt auf die Proliferationshemmung ausübte (siehe roter Pfeil).

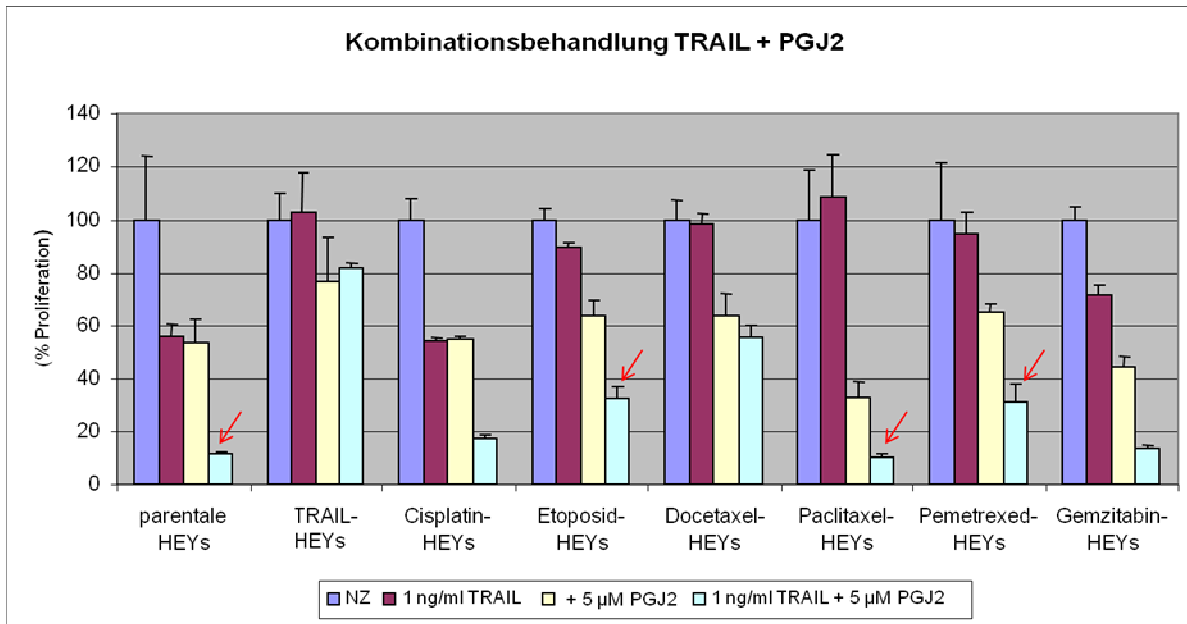


Abbildung 15: Kombinationsbehandlung mit TRAIL und PGJ₂ für 48 Stunden. Die alleinige TRAIL-Behandlung (1 ng/ml, bordeaux) erzielte einen nur sehr geringen antiproliferativen Effekt im Vergleich zu dem stark synergistischen Effekt auf die Proliferationshemmung, der durch die Kombinationsbehandlung aus 1 ng/ml TRAIL und 5 µM PGJ₂ (türkis) in allen Zelllinien, auch in den partiell-TRAIL-resistenten Varianten erzielt werden konnte.

Die alleinige TRAIL-Behandlung führte in den untersuchten Zelllinien zu einem obgleich weniger sensitiven, doch aber tendenziell ähnlichen Effekt wie in den vorangegangenen Experimenten (s. Abb. 13 und 14).

Im Gegensatz zu den PPAR γ -Liganden Ciglitazone und Troglitazone konnte schon mit der Behandlung von 5 µM 15d-PGJ₂ in allen Zelllinien eine verstärkte Proliferationshemmung erzielt werden.

Das Besondere dieser Kombinationsbehandlung ist der synergistische Effekt, der durch die Behandlung mit TRAIL und 15d-PGJ₂ erzielt werden konnte.

Ein besonders starker synergistischer Effekt zeigte sich in den Etoposid-, Docetaxel-, Paclitaxel-, Pemetrexed- und Gemzitabin-resistenten Zelllinien (siehe rote Pfeile).

Auf die TRAIL-resistente Variante wurde kein Kombinationseffekt erzielt.

3.2.2. Effekt von GW9662 auf die durch Kombinationsbehandlung hervorgerufene Proliferationshemmung

Ziel dieses Versuches war es, herauszufinden, ob es durch den Einsatz des PPAR γ -Liganden-Inhibitors GW9662 zu einer Aufhebung des proliferationshemmenden Effekts der PPAR γ -Liganden kommt.

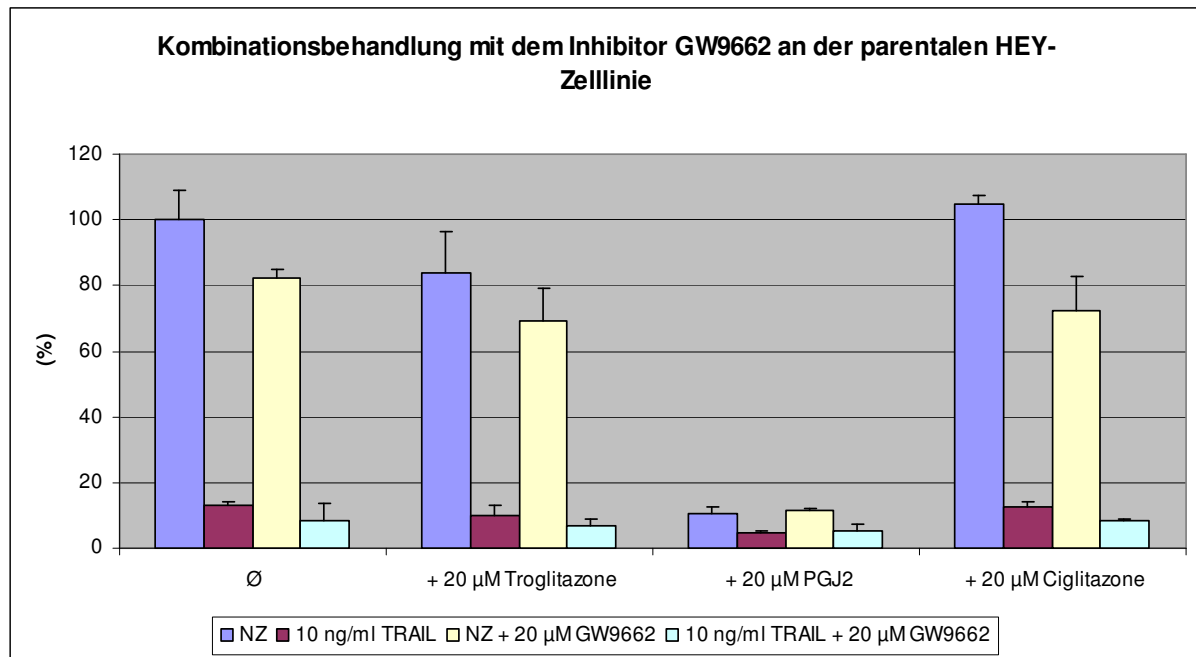


Abbildung 16: Kombinationsbehandlung mit dem PPAR γ -GW9662 an der parentalen HEY-Zelllinie. Dunkelblau = parentale HEY-Zellen ohne bzw. nur unter der Behandlung mit den PPAR γ -Liganden, bordeauxfarbend = alleinige Behandlung mit TRAIL (erstes Quartett) und in Kombination mit den PPAR γ -Liganden, gelb = im ersten Quartett alleinige Behandlung mit 20 µM GW9662 und in den anderen drei jeweils in Kombination mit 20 µM PPAR γ -Ligand und 20 µM GW9662, mint = Kombination aus 20 µM PPAR γ -Ligand, 10 ng/ml TRAIL und 20 µM Inhibitor. Wie aus den gelben und mintfarbenen Balken zu erkennen ist, zeigte sich keine Aufhebung des proliferationshemmenden Effekts der PPAR γ -Liganden durch ihren Inhibitor.

Das erste Säulen-Quartett der Abb. 16 zeigt das Proliferationsverhalten der Zellen, die nicht mit PPAR γ -Liganden behandelt wurden, sondern lediglich mit TRAIL und dem PPAR γ -Liganden-Inhibitoren GW9662.

Sowohl in unbehandelten bzw. nur mit PPAR- γ -Liganden behandelten Zellen (gelber Balken), als auch in denen, die in Kombination mit TRAIL behandelt wurden (mintfarbener Balken), ist durch den Einsatz des PPAR γ -Liganden-Inhibitors GW9662 keine Abschwächung zu erkennen, sondern eine leicht verstärkte Proliferationshemmung. Somit scheint die PPAR γ -

Liganden-bedingte Beeinflussung des Zellwachstums nicht über deren herkömmlichen Signalweg zu erfolgen.

3.2.3. Synergistischer Effekt auf TRAIL-induzierte Apoptoseinduktion durch Kombinationsbehandlung mit PPAR γ -Liganden

Zum Nachweis eines synergistisch apoptotischen Effekts durch zusätzliche Gabe der PPAR γ -Liganden wurden alle Zelllinien, sowohl mit 1 ng/ml TRAIL (bordeaux-farbender Balken), als auch mit der Kombination aus 1 ng/ml TRAIL und jeweils 20 μ M der PPAR γ -Liganden stimuliert (gelb plus Troglitazone, hellblau plus Ciglitazone und lila plus PGJ₂) und anschließend die Apoptoseinduktion mittels DAPI-Färbung der Zellkerne bestimmt (Abb. 17).

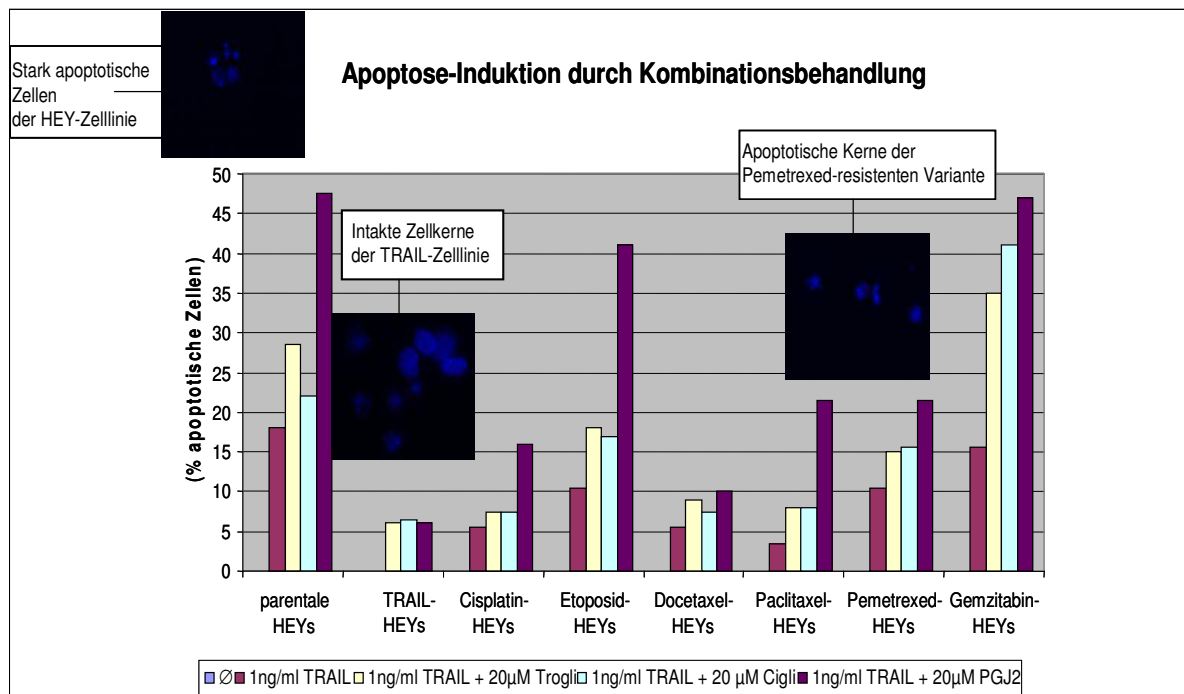


Abbildung 17: Apoptoseinduktion durch die Kombinationsbehandlung aller Zelllinien mit 1 ng/ml TRAIL und jeweils 20 μ M der PPAR γ -Liganden. Die bordeaux-farbenden Balken zeigen die Anzahl der apoptotischen Zellen nach Behandlung mit 1 ng/ml TRAIL, gelb stellt die Kombination mit 20 μ M Troglitazone, hellblau die Kombination mit 20 μ M Ciglitazone und lila die Kombination mit 20 μ M PGJ₂ dar.

Alle drei Liganden verstärken den apoptotischen Effekt von TRAIL, am Ausgeprägtesten war dieser Synergismus jedoch durch die Kombination mit PGJ₂, dargestellt durch den jeweils letzten Balken (lila) eines jeden Quartetts.

3.2.4. Detektion der Proteinexpression der Schlüsselfaktoren nach Kombinationsbehandlung von TRAIL mit Ciglitazone und PGJ₂

In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der Kombinationsbehandlung von TRAIL und den PPAR γ -Liganden auf die Schlüsselfaktoren am Beispiel der parentalen Zelllinie HEY und der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie untersucht.

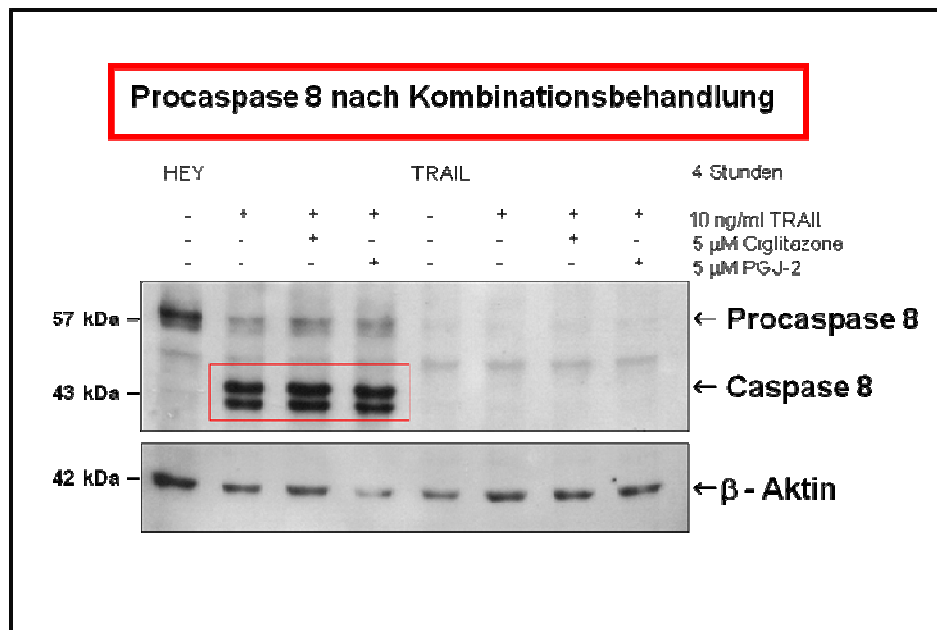


Abbildung 18: Western Blot-Untersuchung der Procaspase 8 nach Kombinationsbehandlung von 10ng/ml TRAIL und jeweils 5 μ M Ciglitazone bzw. PGJ₂. Es kam zur Spaltung der Procaspase 8 in der sensitiven HEY-Zelllinie.

Wie aus der Abbildung 18 zu ersehen ist, kam es in der parentalen Zelllinie HEY sowohl unter einer Behandlung mit 10 ng/ml TRAIL für vier Stunden als auch unter Kombination mit 5 μ M Ciglitazone und PGJ₂ zu einer Spaltung der Procaspase 8 in ihre aktive proapoptotische Form (siehe roter Kasten).

In den TRAIL-resistenten Zellen konnte weder die Expression der Procaspase 8, noch eine Spaltung in deren aktive Form nachgewiesen werden.

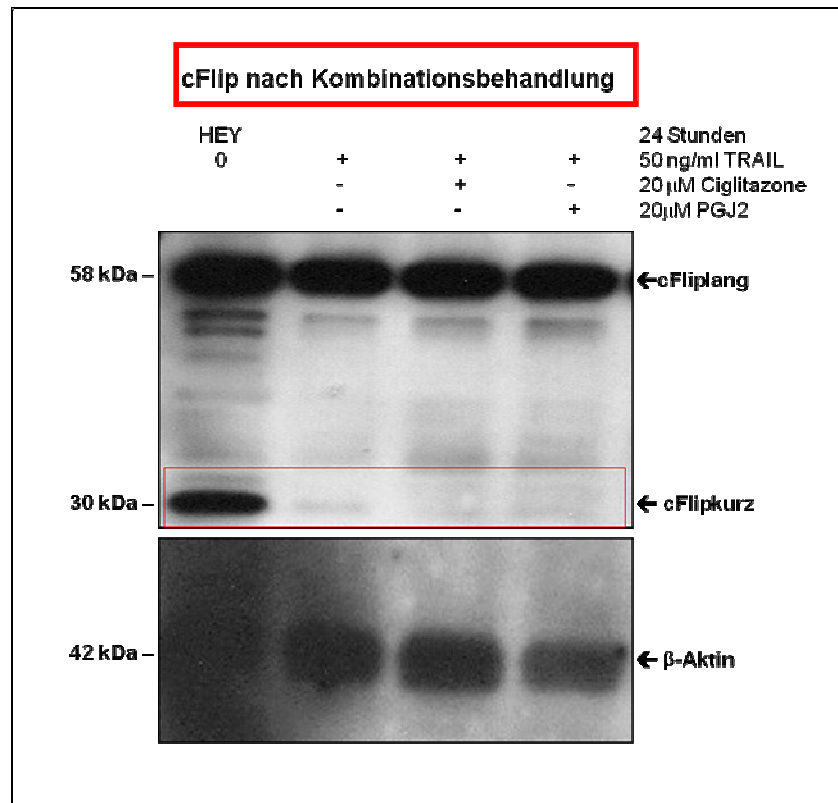


Abbildung 19: Western-Blot-Untersuchung des antiapoptotischen Proteins cFlip nach der Kombinationsbehandlung mit TRAIL und den PPAR γ -Liganden Ciglitazone und PGJ₂. Es zeigte sich keine Expression der kurzen cFlip Variante in den stimulierten Zellen.

Die Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL und in Kombination mit jeweils 20 μ M Ciglitazone sowie PGJ₂ in der parentalen Zelllinie HEY. In der langen cFlip-Spleißvariante blieb die Expression unter der Kombinationsbehandlung unverändert, wo hingegen die Expression der kurzen Variante (cFlip_{kurz}) in den stimulierten Zellen vollständig ausblieb und es somit nicht zu einer weiteren Verminderung der Expression unter Kombinationsbehandlung mit den PPAR γ -Liganden kam (siehe roter Kasten).

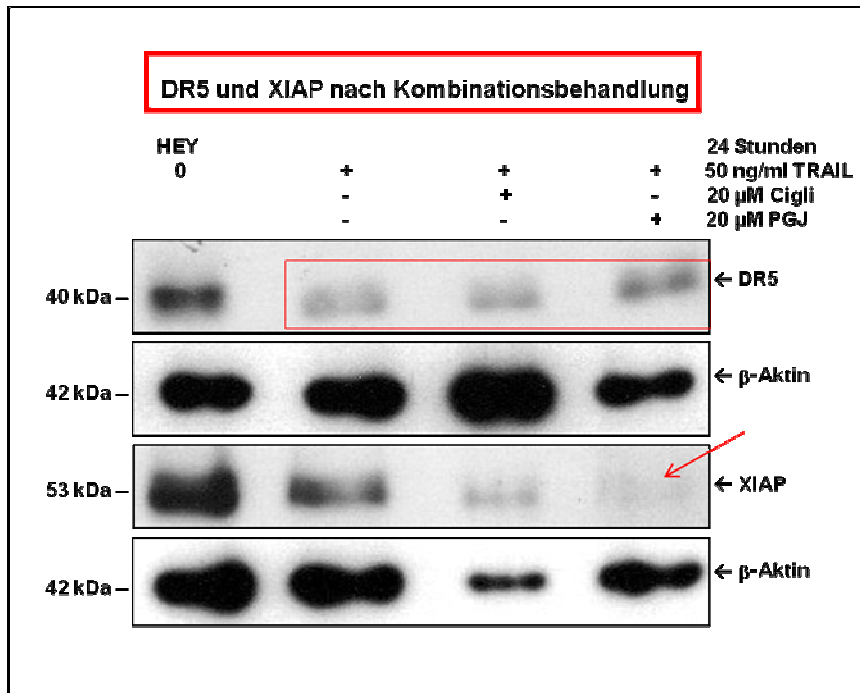


Abbildung 20: Western Blot-Untersuchung des TRAIL-Rezeptors DR5 und des antiapoptotischen Proteins XIAP nach der Kombinationsbehandlung mit TRAIL und den PPAR γ -Liganden Ciglitazone und PGJ₂.

Durch die Behandlung mit TRAIL und PGJ₂ kam es bei XIAP zu einer deutlich stärkeren Herabregulation als bei DR5.

Die Western Blot-Untersuchungen des TRAIL-Rezeptors DR5 haben ergeben, dass es nach einer Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL zu einer Herabregulation des Proteins kommt. Durch die Kombinationsbehandlung mit dem PPAR γ -Liganden PGJ₂ kam es im weiteren Verlauf zu einer Wieder-Hochregulation des DR5-Rezeptors (siehe roter Kasten).

Das antiapoptotische Protein XIAP zeigte nach der TRAIL Behandlung eine deutlich verminderte Expression in den parentalen HEY-Zellen, welche noch deutlich durch die Kombination mit den PPAR γ -Liganden, ganz besonders durch PGJ₂, verstärkt wurde (siehe roter Pfeil).

4. Diskussion

Eines der größten Probleme, welches in der Behandlung von Ovarialkarzinom-Patientinnen beobachtet werden konnte, sind die sich schnell entwickelnden Resistenzen gegenüber den gängigen Chemotherapeutika, wie z.B. Platin- und Taxanderivate.

In jüngster Vergangenheit wurden diesbezüglich große Bemühungen unternommen, um neue molekulare Therapien zu finden, die die Effektivität der vorhandenen Chemotherapeutika steigern und die entstandenen Resistenzen überwinden können.

In verschiedenen Arbeiten wurde über TRAIL berichtet, dass der Ligand in verschiedenen Tumorgeweben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Apoptose induzieren kann (Ashkenazi and Dixit, 1998, Ashkenazi et al., 1999)

Für unsere Arbeit nutzten wir die TRAIL-sensitive Ovarialkarzinom-Zelllinie HEY und eine entsprechende TRAIL-resistente Kontrollzelllinie, um TRAIL-induzierte Effekte auf Zelllinien zu untersuchen, die resistent gegen die bei der Behandlung vom Ovarialkarzinom eingesetzten Chemotherapeutika, wie Cisplatin, Etoposid, Docetaxel, Paclitaxel, Pemetrexed und Gemzitabin sind.

Die Behandlung der Zelllinien mit vergleichbaren oder sogar geringeren TRAIL-Dosierungen als in vorangegangenen Arbeiten über TRAIL-sensitive Prostata- und Ovarialkarzinom-Zelllinien (Lane et al., 2004, Sallman et al., 2007a) führte in allen Zelllinien außer in der Kontrollvariante zu einer Dosis-abhängigen Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion.

Die stärkste Sensitivität zeigten die Pemetrexed- und Etoposid-resistenten Varianten, wohingegen die Taxan-resistenten Zelllinien eine partielle TRAIL-Resistenz aufwiesen. Eine TRAIL-Resistenz konnte auch in Docetaxel-resistenten Prostatatumor-Zelllinien (Sallman et al., 2007b) nachgewiesen werden, während die Kombination von Etoposid und TRAIL einen antikanzerogenen Effekt auf humane Knochentumorzellen (Van Valen et al., 2003) hat und die apoptotische Wirksamkeit in Mammakarzinomzellen erhöht (Gibson et al., 2000, Yoshida et al., 2009).

Kürzlich erschienene Veröffentlichungen wiesen auf einen Zusammenhang zwischen der TRAIL-Resistenz und dem Expressionsmuster der TRAIL-Rezeptoren hin, wie z. B. eine reduzierte DR4- und DR5-, aber eine verstärkte DcR2-Expression in TRAIL-resistenten Mammakarzinom Zellen (Yoshida et al., 2009, Sanlioglu et al., 2005).

In unserer Arbeit ließ sich die Expression aller vier Formen der Todesrezeptoren (DR4 und 5, DcR1 und 2) in den HEY-Zelllinien nachweisen. Diese zeigte sich jedoch in so unterschiedlich starker und inhomogener Ausprägung, dass die Rezeptorexpression, wie auch

in diversen anderen Studien über TRAIL-sensitive Ovarialkarzinom-Zelllinien beschrieben, keinen verlässlichen prädiktiven Marker für die TRAIL-Wirksamkeit darstellt (Vignati et al., 2002, Tomek et al., 2004, Lane et al., 2004).

In Übereinstimmung mit der Arbeit von Lane et al. (Lane et al., 2004) zeigten unsere HEY-Zelllinien eine vermehrte Expression des Todesrezeptors DR5 im Vergleich zu DR4, was die Hypothese zulässt, dass die TRAIL-induzierte Apoptose hauptsächlich über eine DR5-Aktivierung unabhängig von der jeweiligen TRAIL-Sensitivität induziert wird.

Eine Ausnahme stellt jedoch die Gemzitabin-resistente Variante dar, welche eine erhöhte Expression von DR4 gegenüber DR5 zeigte, und was darauf hindeutet, dass diese Zelllinie die TRAIL-induzierte Apoptose über DR4 einleitet.

Eine erhöhte DR4-Expression konnte kürzlich für eine erhöhte TRAIL-Sensitivität in Kolonkarzinomzellen verantwortlich gemacht werden und könnte als Hinweis für die erhöhte Sensitivität der Gemzitabin-Zelllinien angesehen werden (Sussman et al., 2007).

Das Fehlen einer Korrelation zwischen der Expression der TRAIL-Rezeptoren und der Sensitivität der unterschiedlichen HEY-Zelllinien könnte durch eine autokrine Produktion von löslichen „Decoy“-Rezeptoren durch resistente Zellen erklärt werden. Hierzu gehört z. B. Osteoprotegerin (OPG), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, welches im Wettbewerb mit den bekannten TRAIL-Rezeptoren um die TRAIL-Liganden-Bindung steht. Es konnte gezeigt werden, dass OPG in Ovarialkarzinom-Zelllinien exprimiert wird (Tomek et al., 2004, Holen et al., 2002, Horak et al., 2005) und es bei relativ niedrig-dosierter TRAIL-Behandlung (50 ng/ml) sowohl in Myelom- als auch in Prostatakarzinom-Zelllinien die TRAIL-induzierte Apoptose hemmt (Holen et al., 2002, Shipman et al., 2003).

Eine weitere Erklärung für die uneinheitliche Rezeptor-Expression könnte eine TRAIL-induzierte Internalisierung seiner Todesrezeptoren sein, wie es für Kolonkarzinom- und Mammakarzinom-Zellen (Austin et al., 2006, Zhang et al., 2009) beschrieben wurde. Die internalisierten Rezeptoren gelangen somit ins Zytosol und stehen nicht mehr für die Signaltransduktion zu Verfügung, werden aber bei der Analyse des Gesamtproteins nachgewiesen.

Die Rolle des FLIP_{lang}-Proteins in der TRAIL-induzierten Apoptose wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite konnte eine Überexpression mit TRAIL-Resistenz und Inhibierung der Apoptose in verschiedenen Tumoren assoziiert werden (Kim et al., 2000, Griffith et al., 1998, Horak and Horvat, 2005), auf der anderen Seite wurden auch proapoptotische Effekte durch FLIP_{lang} beschrieben (Micheau et al., 2002, Krueger et al., 2001). Mit Ausnahme der Gemzitabin-resistenten Zelllinien, in denen es zu einem Anstieg der

Proteinexpression kam, ergaben unsere Untersuchungen vergleichbare FLIP_{lang}-Expressions-Level in allen untersuchten HEY-Varianten. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Expression von FLIP_{lang} in keinem Zusammenhang mit der TRAIL-Sensitivität stehen.

Im Gegensatz zu FLIP_{lang} wurde FLIP_{kurz} eindeutig als Inhibitor der Apoptose beschrieben (Krueger et al., 2001), so konnte gezeigt werden, dass es durch eine Herabregulation dieses Proteins zu einer verstärkten proapoptotischen TRAIL-Wirkung in verschiedenen Tumorzellen kommt (Zou et al., 2007, Wang et al., 2007). In unseren Ergebnissen zeigte sich keine klare Tendenz von FLIP_{kurz}-Expression, obwohl dessen schwächste Ausprägung in den Etoposid- und Pemetrexed-resistenten Zelllinien auf einen Zusammenhang mit der TRAIL Sensitivität hindeutet.

Interessanterweise scheint die Expression des antiapoptotischen Proteins XIAP eine Korrelation zur TRAIL-Sensitivität widerzuspiegeln, verglichen mit den FLIP-Expressionsmustern zeigt sich jedoch ein gegensätzliches Resultat: Die TRAIL-sensitiven Zelllinien, wie die gegen Cisplatin-, Etoposid- und Pemetrexed-resistenten Varianten sowie die parentale HEY-Zelllinie wiesen eine stärkere XIAP-Expression als die Taxan-resistenten und die gegen TRAIL-resistente Kontrollzelllinie auf.

Eine Erklärung hierfür könnte in der beschriebenen Verbindung von hoher XIAP-Expression und stark proliferierenden Ovarialkarzinomzellen liegen (Li et al., 2001), was auch für das Wachstumsverhalten der HEY-Varianten außer den langsamer wachsenden Taxan-resistenten Zelllinien zutrifft. Wiederum scheint die Gemzitabin-resistente Variante eine Ausnahme darzustellen, denn im Gegensatz zu ihrer hohen FLIP-Expression wiesen diese die niedrigste XIAP-Expression auf.

In Übereinstimmung mit der TRAIL-Sensitivität konnten wir eine starke Expression des proapoptotischen Proteins p-FADD in der Etoposid-resistenten Variante feststellen, wohingegen die partiell TRAIL-resistenten Docetaxel-resistenten und TRAIL-resistenten Zelllinien eine deutlich geringere Ausprägung des phosphorylierten FADD-Proteins aufwiesen.

Der Schlüsselfaktor des TRAIL-induzierten Apoptosesignalwegs, das proapoptotische Protein Caspase-8, ließ sich in allen Zelllinien außer in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie nachweisen, welches die Erklärung für die vollständige TRAIL-Resistenz dieser Variante liefern könnte.

In kleinzelligen Lungenkarzinomzellen, die häufig einen Mangel an Caspase 8 aufweisen, ist TRAIL nicht in der Lage, die Apoptose zu induzieren, sondern steigert stattdessen in Abhängigkeit von DR5-Expression die Zellproliferation (Belyanskaya et al., 2008). In

unseren Studien konnte eine verstärkte DR5 Expression nach der Behandlung mit TRAIL in den partiell TRAIL-resistenten und der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie nachgewiesen werden, womit sich die DR5-Expression in Kombination mit einer geringen oder fehlenden Caspase-8 Expression als ein negativ bestimmender Faktor für den Erfolg der TRAIL-induzierten Krebstherapie darstellen könnte.

Die TRAIL-sensitiven Varianten, die Cisplatin- und Etoposid-resistenten Zellen, zeigten nach der Behandlung eine Abnahme von DR5; ein signifikanter Anstieg konnte für die DcR2-Expression in den parentalen, Docetaxel-, Pemetrexed- und Genzitinab-resistenten Zelllinien beobachtet werden, ohne auf einen Zusammenhang zwischen der TRAIL-Sensitivität und TRAIL-Rezeptor Expression hinzudeuten.

Im Unterschied zu den unbehandelten Zellen war FLIP_{kurz} auch nach der TRAIL-Behandlung stark in der partiell TRAIL-resistenten Docetaxel-resistenten Zelllinie vorhanden. Die übrigen Zelllinien wiesen bereits ohne Behandlung eine geringe Expression der kurzen Spleißvariante von FLIP auf, welche sich dann unter Stimulation noch verringerte.

Schon vorausgegangene Studien haben zeigen können, dass eine verringerte Expression der antiapoptischen Proteine cFLIP und XIAP eng mit einem gesteigerten apoptotischen Effekt assoziiert ist (Kim et al., 2000, Griffith et al., 1998). Auch in unseren Studien ließen sich nach einer TRAIL-Behandlung verringerte XIAP-Proteinlevel nachweisen. Die stärkste Abnahme fand in den TRAIL-sensitiven Zelllinien statt, wohingegen die partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Varianten nur eine geringfügige Verminderung und die TRAIL-resistenten Zellen keine Abnahme der Proteinexpression aufwiesen.

Eine identische Beobachtung konnte für die aktive Form des proapoptischen Proteins FADD gemacht werden, welche darüber hinaus noch mit der Expression von DR5 und Caspase8 nach der Behandlung mit TRAIL korrelierte. In den Untersuchungen von Kang et al., 2003 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von FADD ein früher Prozess des TRAIL-Signalweges ist und daher sowohl die Übereinstimmung mit der DR5 und Caspase 8, sowie die Abnahme von p-FADD das Resultat einer vorangegangenen Phosphorylierung und einer anschließenden Dephosphorylierung sein könnte, da die Gesamtproteinmenge von FADD nicht beeinflusst wurde (Kang et al., 2003).

Die vollständige Spaltung der Caspase-8 in ihre aktive Form konnte durch die TRAIL-Behandlung in den TRAIL-sensitiven Zelllinien erreicht werden, wohingegen es in den partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Zelllinien zu einer unvollständigen Spaltung kam, welche in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie ausblieb. In Übereinstimmung mit vorausgegangenen Studien korreliert dieser Verlust bzw. die Verminderung der Caspase 8-

Aktivierung mit einer Resistenz von Karzinomzellen gegenüber der apoptotischen Wirkung von TRAIL (Tomek et al., 2004, Grotzer et al., 2000).

Um herauszufinden, ob sich ein synergistischer Effekt auf die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion ausübt, haben wir TRAIL in sehr geringen Dosierungen (1 ng/ml) jeweils mit einem der drei PPAR γ -Liganden Ciglitazone, Troglitazone und 15d-PGJ₂ kombiniert.

Wie bereits für verschiedene Tumorzellen gezeigt, konnten auch wir einen synergistischen Effekt durch die Kombinationsbehandlung mit allen drei Liganden in den HEY-Zelllinien nachweisen (Kim et al., 2002). Die Behandlung mit 50 μ M Ciglitazone oder Troglitazone alleine zeigte keinen bzw. nur einen sehr geringen proliferationshemmenden Effekt, jedoch konnte durch die Kombination mit 1 ng/ml TRAIL eine gesteigerte Proliferationshemmung in allen Zelllinien außer in der TRAIL-resistenten Kontrollzelllinie erzielt werden.

Stärkster synergistischer Effekt durch die Kombination mit Ciglitazone zeigte sich in der Paclitaxel-resistenten Zelllinie, während die Etoposid-resistenten Zellen am stärksten auf die Kombination aus TRAIL mit Troglitazone reagierten.

Ogleich 15dPGJ₂ auch schon alleine einen inhibitorischen Effekt aufwies, konnte darüber hinaus ein starker synergistischer Effekt in den Etoposid-, Paclitaxel- und Pemetrexed-resistenten Zelllinien ermittelt werden. Der Tatsache entsprechend, dass dieser PPAR γ -Ligand eine proliferationshemmende Eigenaktivität aufwies, lies sich die stärkste Apoptoseinduktion durch eine Kombination aus TRAIL und 15d-PGJ₂ erzielen, was ebenfalls für die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 beschrieben werden konnte (Kim et al., 2002). Für die TRAIL-sensitive HEY-Zelllinie zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der gesteigerten TRAIL-induzierten Apoptose durch die Kombination mit 15d-PGJ₂, und einer verstärkten Expression des Todesrezeptors DR5, was übereinstimmend mit früheren Berichten für TRAIL-sensitive Jurkatzellen, Bronchialkarzinomzellen und Urothelkarzinomzellen ist (Zou et al., 2007, Nakata et al., 2006, Plissonnier et al., 2010).

Da eine alleinige TRAIL-Behandlung bereits eine vollständige Abnahme der FLIP_{kurz}-Expression erzeugte, konnte keine weiter Expressionsminderung durch die Kombination mit den PPAR γ -Liganden erzielt werden, wie bei Kim et al. beschrieben (Kim et al., 2002).

Allerdings wurde für XIAP durch die Kombinationen von TRAIL mit Ciglitazone, und v. a. mit 15d-PGJ₂ eine weiter Minderung der Proteinlevel erreicht, was in enger Beziehung zu dem positiv-synergistischen Effekt auf die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion steht. Eine Herabregulation von XIAP durch eine Kombinationsbehandlung wurde ebenfalls für Leukämiezellen und Leberkarzinomzellen nachgewiesen und - übereinstimmend mit unseren Ergebnissen - ließ sich die Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose durch die

PPAR γ -Liganden nicht durch einen PPAR γ -Inhibitor (GW9662) inhibieren, was auf einen unabhängigen PPAR γ -Signalweg hinweist (Han et al., 2007, Okano et al., 2003).

Wir konnten in unseren Ergebnissen nachweisen, dass es möglich ist, in chemoresistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien durch eine gering-dosierte TRAIL-Behandlung eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion hervorzurufen. Obwohl die Taxan-resistenten Zelllinien eine partielle TRAIL-Resistenz verglichen mit den TRAIL-sensitiven Etoposid- und Pemetrexed-resistenten Varianten aufweisen, war es uns nicht möglich, eine eindeutige Korrelation zwischen den Schlüsselfaktoren des TRAIL-Signalweges und der TRAIL-Sensitivität nachzuweisen.

Wir zeigten, dass alle PPAR γ -Liganden in der Kombination mit TRAIL einen synergistischen Effekt ausübten. Wenngleich die eingesetzten Konzentrationen beider Stoffe nicht hoch genug waren, um die vollständige TRAIL-Resistenz zu überwinden, konnten wir dennoch einen positiv synergistischen Effekt auf die partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Zelllinien ausüben.

Auch die übrigen Untersuchungen in den TRAIL-sensitiven chemoresistenten Zelllinien deuten durch die vermehrte Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion darauf hin, dass die Kombinationsbehandlung aus niedrig dosiertem TRAIL und PPAR γ -Liganden eine vielversprechende Therapiemöglichkeit zur Überwindung der Resistenzen gegen die eingesetzten Chemotherapeutika beim Ovarialkarzinom sein könnte.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom hat durch die häufige Entwicklung von Zytostatikaresistenzen eine besonders schlechte Prognose, so dass der Überwindung dieser Resistenzen eine besonders große Bedeutung zukommt. Die vorliegenden Untersuchungen dienen zur Analyse der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion durch den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) an HEY-Zelllinien mit selektiver Zytostatikaresistenz gegen die beim Ovarialkarzinom eingesetzten Chemotherapeutika.

TRAIL stellt einen der wenigen Stoffe dar, mit denen die gezielte Therapie einer malignen Erkrankung möglich ist, ohne physiologische Zellverbände zu beeinflussen.

Mit Hilfe verschiedener Proliferationsassays konnte im ersten Teil der Arbeit eine Dosis-abhängige Proliferationshemmung in allen Zelllinien nachgewiesen werden, wobei die Taxan-resistenten Varianten eine partielle TRAIL-Resistenz aufwiesen und die TRAIL-resistente Kontroll-Zelllinie nicht beeinflusst wurde. Darüber hinaus konnte mittels Färbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff DAPI bewiesen werden, dass TRAIL schon in geringen Konzentrationen Apoptose in den Ovarialkarzinomzelllinien auslöst. Die Zellen zeigten hier ein ähnliches Ansprechen auf TRAIL wie zuvor im Proliferationsassay.

Die Untersuchung der Proteinexpression der Schlüsselfaktoren des TRAIL-Signalweges zeigte, dass alle vier Todesrezeptoren sowie pro- als auch antiapoptotische Proteine in allen Zelllinien nachweisbar waren. Eine Ausnahme stellte die Caspase 8 dar, die in der TRAIL-resistenten Linie nicht exprimiert wurde.

Ein Zusammenhang zwischen der Expression und dem Ansprechen der Zellen auf eine TRAIL-Behandlung lies sich für das antiapoptotische Protein XIAP nachweisen. TRAIL führte in den sensitiven Zelllinien zu einer stark verminderten Expression dieses Proteins, wohingegen die partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten und die TRAIL-resistente Kontrollvariante keine bzw. eine geringe Herabregulation aufwiesen.

Die Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL führte in den sensitive Zelllinien zu einer Spaltung der inaktiven Procaspase 8 in ihre aktive, proapoptotische Form, welche in den Taxan-resistenten Zelllinien nur unvollständig stattfand.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Kombination von TRAIL mit den bei der Diabetestherapie eingesetzten PPAR γ -Liganden zu einem verstärkten apoptotischen Effekt kam. Am ausgeprägtesten war dieser Synergismus durch die Kombination mit 15d-PGJ₂. Endlich ließ sich durch diese Kombinationsbehandlung auch in

den partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Varianten eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion erzielen. Die Proteinexpressionsanalysen von DR5, Caspase 8, cFlip und XIAP unterstreichen die Ergebnisse der Proliferationsassays.

Untersuchungen mit dem PPAR γ -Liganden-Inhibitors GW9662 wiesen darauf hin, dass die Beeinflussung des Zellwachstums durch die PPAR γ -Liganden nicht über deren herkömmlichen Signalweg erfolgte.

TRAIL zeigte in den durchgeführten Untersuchungen eine Hemmung der Proliferation und Induktion der Apoptose in chemoresistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien, welche sich durch die Kombination mit den aus der Diabetestherapie bekannten PPAR γ -Liganden noch verstärken ließ und einen positiv synergistischen Effekt auf die partiell TRAIL-resistenten Taxan-resistenten Zelllinien ausübte.

Die Kombination aus TRAIL und PPAR γ -Liganden könnte somit eine vielversprechende Möglichkeit zur Therapie des Ovarialkarzinoms sein.

6. Literatur

- ASHKENAZI, A. E. A. & DIXIT, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- ASHKENAZI, A. E. A., PAI, R. C., FONG, S., LEUNG, S., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S. A., BLACKIE, C., CHANG, L., MCMURTREY, A. E., HEBERT, A., DEFORGE, L., KOUMENIS, I. L., LEWIS, D., HARRIS, L., BUSSIÈRE, J., KOEPPEN, H., SHAHROKH, Z. & SCHWALL, R. H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104, 155-62.
- ASSELIN, E. E. A., MILLS, G. B. & TSANG, B. K. (2001) XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res*, 61, 1862-8.
- AUSTIN, C. D., LAWRENCE, D. A., PEDEN, A. A., VARFOLOMEEV, E. E., TOTPAL, K., DE MAZIERE, A. M., KLUMPERMAN, J., ARNOTT, D., PHAM, V., SCHELLER, R. H. & ASHKENAZI, A. (2006) Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10283-8.
- BELYANSKAYA LL, Z. A., HOPKINS-DONALDSON S, KURTZ S, SIMON & HU, S. R., ZANGEMEISTER-WITTKKE U (2008) Trail-induced survival and proliferation of sclc cells is mediated by erk and dependent on trail-r2/dr5 expression in the absence of caspase-8. *Lung Cancer* 60, 355-365.
- BODMER, J. E. A., HOLLER N, REYNARD S, VINCIGUERRA P, SCHNEIDER P, JUO P, BLENIS J & J, T. (2000) Trail receptor-2 signals apoptosis through fadd and caspase-8 *Nat Cell Biol* 2 241-243.
- BRÄUTIGAM K, BAUERSCHLAG DO, WEIGEL MT, BIERNATH-WÜPPING J, BAUKNECHT T, ARNOLD N, MAASS N, MEINHOLD-HEERLEIN I (2009) Combination of enzastaurin and pemetrexed inhibits cell growth and induces apoptosis of chemoresistant ovarian cancer cells regulating extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Translational Oncology*, 18, 164-73.
- CANNISTRA, S. A. (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, 351, 2519-29.
- CUELLO, M. E. A., ETTENBERG, S. A., NAU, M. M. & LIPKOWITZ, S. (2001) Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, 81, 380-90.
- FERNANDEZ-VELEDO, S. E. A., NIETO-VAZQUEZ, I., VILA-BEDMAR, R., GARCIA-GUERRA, L., ALONSO-CHAMORRO, M. & LORENZO, M. (2009) Molecular mechanisms involved in obesity-associated insulin resistance: therapeutical approach. *Arch Physiol Biochem*, 115, 227-39.
- GHOBRIAL I.M ET AL., T. E. W. A. A. A. A. (2005) Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 55, 178-194.
- GIBSON SB, O. R., SPALDING AC, ANDERSON SM, JOHNSON GL (2000) Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and trail. *Mol Cell Biol* 20, 205-212.
- GRIFFITH TS, C. W., JACKSON GC, LYNCH DH, KUBIN MZ (1998) Intracellular regulation of trail-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol*, 161, 2833-2840.
- GROTZER MA, E. A., ZUZAK TJ, JANSS AJ, MARWAHA S, WIEWRODT BR, & IKEGAKI N, B. G., PHILLIPS PC (2000) Resistance to trail-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene*, 19, 4604-4610.
- HAN, H. E. A., SHIN, S. W., SEO, C. Y., KWON, H. C., HAN, J. Y., KIM, I. H., KWAK, J. Y. & PARK, J. I. (2007) 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ 2)

- sensitizes human leukemic HL-60 cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through Akt downregulation. *Apoptosis*, 12, 2101-14.
- HANAHAH D, W. R.** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HAO C, E. A., BEGUINOT F, CONDORELLI G, T., RENCIA A, VAN MEIR EG, YONG VW, PARNEY IF, ROA WH & KC, P.** (2001) Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail) mediated apoptosis in human malignant glioma cells. *Cancer Res*, 61, 1162-1170.
- HENGARTNER, M. O.** (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- HOLEN I, C. P., HAMDY FC, EATON CL** (2002) Osteoprotegerin (opg) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62, 1619-1623.
- HOLSCHNEIDER, C. H. & BEREK, J. S.** (2000) Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*, 19, 3-10.
- HORAK P, P. D., KAIDER A, PINTER A, ELANDT K, SAX C, ZIELINSKI CC, & HORVAT R, Z. R., REINTHALLER A, KRAINER M** (2005) Perturbation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cascade in ovarian cancer: overexpression of Xipl and deregulation of the functional receptors dr4 and dr5. *Clin Cancer Res*, 11, 8585-8591.
- HORAK, P., PILS, D., HALLER, G., PRIBILL, I., ROESSLER, M., TOMEK, S., HORVAT, R., ZEILLINGER, R., ZIELINSKI, C. & KRAINER, M.** (2005) Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res*, 3, 335-43.
- IRMLER M, E. A., THOME M, HAHNE M, SCHNEIDER P, HOFMANN K, STEINER V, BODMER JL, SCHROTER M, BURNS K, MATTMANN C, RIMOLDI D, FRENCH LE & J, T.** (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular Flip. *Nature*, 388, 190-195.
- KANG, J., KISENGE, R. R., TOYODA, H., TANAKA, S., BU, J., AZUMA, E. & KOMADA, Y.** (2003) Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines. *British Journal of Haematology*, 123, 921-932.
- KIM K, E. A., FISHER MJ, XU SQ & WS, E.-D.** (2000) Molecular determinants of response to trail in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res*, 6, 335-346.
- KIM, Y. E. A., SUH, N., SPORN, M. & REED, J. C.** (2002) An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277, 22320-9.
- KRUEGER A, S. I., BAUMANN S, KRAMMER PH, KIRCHHOV S** (2001) Cellular Flice-inhibitory protein splice variants inhibit differentsteps of caspase-8 activation at the cd95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 276, 20633-20640.
- LANE, D., CARTIER, A., L'ESPERANCE, S., COTE, M., RANCOURT, C. & PICHE, A.** (2004) Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 93, 594-604.
- LEBOVITZ, H. E. & BANERJI, M. A.** (2001) Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog Horm Res*, 56, 265-94.
- LEITLINIEN, D. K.** (2000) Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. *Deutsche Krebsgesellschaft*.
- LI J, F. Q., KIM JM, SCHNEIDERMAN D, LISTON P, LI M, VANDERHYDEN & B, F. W., FUNG MF, SENTERMAN M, KORNELUK RG, TSANG BK** (2001) Human

ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology*, 142.

- MEINHOLD-HEERLEIN, I. B.-E., K.; U. GRÜNN, D. BAUERSCHLAG, N. MAASS, C. MUNDHENKE, W. JONAT, T. BAUKNECHT** (2005) TRAIL-Induced Apoptosis of Ovarian Cancer Cell Lines With Selective Drug Resistance *Geburtsh Frauenheilk*, 65, 1064–1073.
- MEINHOLD-HEERLEIN, I. M., N. AND JONAT, W.** (2004) Apoptose und Antiangiogenese Therapieprinzipien der gynäkologischen Onkologie. *Der Gynäkologe*, 37, 222-229.
- MICHEAU O, T. M., SCHNEIDER P, HOLLER N, TSCHOPP J, NICHOLSON & DW, B. C., GRUTTER MG** (2002) The long form of Xip is an activator of caspase-8 at the fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 277, 45162–45171.
- NAKATA S, E. A., YOSHIDA T, SHIRAISHI T, HORINAKA M, KOUHARA J, WAKADA M & T, S.** (2006) 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin j(2) induces death receptor 5 expression through mrna stabilization independently of ppargamma and potentiates trail-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 5, 1827–1835.
- OKANO H, S. K., INOUE H, YAMANAKA Y, KAWAKITA T, SAITOU Y,, YAMAGUCHI Y, E. N., YAMAMOTO N, SUGIMOTO K, MURATA & K, N. T.** (2003) 15-deoxy-delta-12-14-pgj2 regulates apoptosis induction and nuclear factor-kappab activation via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*, 83, 1529–1539.
- PAN, G. E. A., NI, J., WEI, Y. F., YU, G., GENTZ, R. & DIXIT, V. M.** (1997a) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277, 815-8.
- PAN, G. E. A., O'ROURKE, K., CHINNAIYAN, A. M., GENTZ, R., EBNER, R., NI, J. & DIXIT, V. M.** (1997b) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-3.
- PARTRIDGE EE, B. M.** (1999) Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin*, 49, 297-320.
- PFISTERER, J. & DU BOIS, A.** (2007) Standarts in der Therapie des Ovarialkarzinoms *Pathologe*, 28, 222–228.
- PITTI RM, E. A., MARSTERS SA, RUPPERT S, DONAHUE CJ, MOORE A, ASHKENAZI &** (1996) Induction of apoptosis by apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. . *J Biol Chem*, 271, 12687–12690.
- PLISSONNIER ML, F. S., BITTARD H, LASCOMBE I** (2010) Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (ppargamma ligand)-promoted apoptosis in trail-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. . *Int J Cancer*.
- QIAO, L. E. A., DAI, Y., GU, Q., CHAN, K. W., MA, J., LAN, H. Y., ZOU, B., ROCKEN, C., EBERT, M. P. & WONG, B. C.** (2008) Loss of XIAP sensitizes colon cancer cells to PPARgamma independent antitumor effects of troglitazone and 15-PGJ2. *Cancer Lett*, 268, 260-71.
- RUMI MA, ISHIHARA S, KAZUMORI H, KADOWAKI Y & Y, K.** (2004) Can ppar gamma ligands be used in cancer therapy? *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4, 465-477.
- SAFAAR, E. A., DAY TW & CH, W.** (2008) Cellular Flice-like inhibitory protein (c-Flip): a novel target for cancer therapy. . *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 37-46.
- SALLMAN DA, C. X., ZHONG B, GILVARY DL, ZHOU J, WEI S, DJEU JY** (2007a) Clusterin mediates trail resistance in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther* 6, 2938-2947.

- SALLMAN DA, C. X., ZHONG B, GILVARY DL, ZHOU J, WEI S, DJEU JY** (2007b) Clusterin mediates trail resistance in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther*; 6, 2938–2947.
- SANLIOGLU AD, D. E., AYDIN C, ERIN N, KOKSOY S, SANLIOGLU S** (2005) Surface trail decoy receptor-4 expression is correlated with trail resistance in mcf7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 5:54
- SASAKI H, S. Y., KOTSUJI F, TSANG BK** (2000) Down-regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 60, 5659–5666.
- SCHULTZE K, E. A., BOCK B, ECKERT A, OEVERMANN L, RAMACHER D, WIESTLER O & W, R.** (2006) Troglitazone sensitizes tumor cells to trail-induced apoptosis via down-regulation of Xip and survivin. *Apoptosis*, 11, 1503-1512.
- SEMPLE, R. K. E. A., CHATTERJEE, V. K. & O'RAHILLY, S.** (2006) PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*, 116, 581-9.
- SHIPMAN CM, C. P.** (2003) Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res*, 63, 912-916.
- SINGH, T. R. E. A., SHANKAR, S., CHEN, X., ASIM, M. & SRIVASTAVA, R. K.** (2003) Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res*, 63, 5390-400.
- SPORN MB, E. A., SUH N & DJ, M.** (2001) Prospects for prevention and treatment of cancer with selective ppargamma modulators (sparms). . *Trends Mol Med* 7, 395-400.
- SUSSMAN, R. T., RICCI, M. S., HART, L. S., SUN, S. Y. & EL-DEIRY, W. S.** (2007) Chemotherapy-resistant side-population of colon cancer cells has a higher sensitivity to TRAIL than the non-SP, a higher expression of c-Myc and TRAIL-receptor DR4. *Cancer Biol Ther*; 6, 1490-5.
- TOMEK, E. A., HORAK P, PRIBILL I, HALLER G, ROSSLER M, ZIELINSKI CC, PILS D & M, K.** (2004) Resistance to trail-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines is overcome by co-treatment with cytotoxic drugs. *Gynecol Oncol*, 94, 107-114.
- TRAUZOLD, A. E. 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, 7434-9.
- VAN VALEN F, F. S., SCHAFER KL, TRUCKENBROD B, HOTWLDER M, POREMBA & C, D. K., WINKELMANN W** (2003) Selective and nonselective toxicity of trail/apo2l combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. Normal human cells. . *Int J Cancer*, 107, 929-940.
- VIGNATI, S., ALBERTINI, V., RINALDI, A., KWEE, I., RIVA, C., OLDRINI, R., CAPELLA, C., BERTONI, F., CARBONE, G. M. & CATAPANO, C. V.** (2006) Cellular and molecular consequences of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in ovarian cancer cells. *Neoplasia*, 8, 851-61.
- VIGNATI S, E. A., CODEGONI A, POLATO F & M, B.** (2002) Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs. *Eur J Cancer* 38, 177-183.
- WANG P, Z. J., BELLAIL A, JIANG W, HUGH J, KNETEMAN NM, & C, H.** (2007) Inhibition of rip and c-Flip enhances trail-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cell Signal*, 19, 2237–2246.
- WILEY SR, E. A., SCHOOLEY K, SMOLAK PJ, DIN WS, HUANG CP, NICHOLL JK, SUTHERLAND GR, SMITH TD, RAUCH C & AL, S. C. E.** (1995) Identification

and characterization of a new member of the tnf family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682.

- YANG X, E. A., XING H, GAO Q, CHEN G, LU Y, WANG S & D, M.** (2005) Regulation of htra2/omi by x-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells. . *Gynecol Oncol*, 97, 413-421.
- YOSHIDA T, Z. Y., ROSADO LA, ZHANG B** (2009) Repeated treatment with subtoxic doses of trail induces resistance to apoptosis through its death receptors in mda-mb-231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, 7, 1835–1844.
- ZHANG Y, Y. T., ZHANG B** (2009) Trail induces endocytosis of its death receptors in mda-mb-231 breast cancer cells. . *Cancer Biol Ther*, 8, 917-922.
- ZOU, W. E. A., LIU, X., YUE, P., KHURI, F. R. & SUN, S. Y.** (2007) PPARgamma ligands enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and c-FLIP downregulation in human lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 6, 99-106.

7. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Jonat dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit an der Universitätsfrauenklinik Kiel durchführen zu können.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ivo Meinhold-Heerlein, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei dem experimentellen Teil und der Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold möchte ich dafür danken, dass ich den experimentellen Teil dieser Arbeit in dem von ihm geleiteten Onkologielabor der Universitätsfrauenklinik Kiel ausführen konnte.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. rer. nat. Karen Bräutigam für die tatkräftige Unterstützung und die Vielzahl an Hilfestellungen, sowie für die aufgeopferte Zeit zur Vollendung dieser Arbeit.

Ein großes „Dankeschön“ für die engagierte Einweisung in das Arbeitsgebiet, Erlernung der Techniken und ein stets offenes Ohr für jegliche Schwierigkeiten.

Darüber hinaus gilt mein Dank den medizinisch technischen Assistentinnen aus dem onkologischen Labor für die gute Zusammenarbeit, die fachkundigen Ratschläge und das freundliche Arbeitsklima. Desweiteren danke ich den radiologisch technischen Assistentinnen aus dem Mammazentrum der Universitätsfrauenklinik Kiel für ihre großzügige Hilfsbereitschaft. An die gemeinsame Arbeitszeit mit Frau Inke Lühr erinnere ich mich gern und dankbar zurück.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meinen Eltern und Geschwistern, dass sie mich immer darin bestärkt haben, mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren. Danke für die langjährige moralische Unterstützung.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Biernath-Wüpping
Geburtsdatum: 21.03.1985
Geburtsort : Kiel
Adresse: Jungfernstieg 22, 24103 Kiel
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulbildung

1992-1995 Grundschule Strande
1995-2004 Kieler-Gelehrtenschule, Kiel, Abitur
2001-2002 Rotary Schüleraustausch in Easton, Maryland/USA,
Besuch der 12. Klasse der Easton High School

Hochschulbildung

Oktober, 2004 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrecht-Universität, Kiel

August, 2006 1. Staatsexamen

Februar, 2007 Beginn der Doktorarbeit, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Campus Kiel

Dezember, 2008 Beendigung der Labor Experimente zur Doktorarbeit

August, 2009 Beginn des Praktischen Jahres

Oktober, 2010 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

1. Terial: Chirurgie 1. Hälfte: Regionalspital Rheinfelden, Rheinfelden, Schweiz
2. Hälfte: Städtisches Krankenhaus Kiel

2. Terial: Gynäkologie Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

3. Terial Innere Medizin Kreiskrankenhaus Eckernförde

Famulaturen

- 01.08.-31.8.2007
Praxisfamulatur im Brustzentrum Düsseldorf,
Dr. Mahdi Rezaei; Facharzt für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe
- 03.09.-02.10.2007
Wahlfamulatur im onkologischen Labor des
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Klinik für
Gynäkologie und Geburtshilfe, Campus Kiel, Prof.Dr.Arnold
- 18.02.-19.03.2008
Auslandsfamulatur in Indien; Vishesh Hospital,
Indore Pädiatrie und Chirurgie
- 04.08.-02.09.2008
Klinikfamulatur; Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Campus Kiel

Veröffentlichungen

- April 2008
Vortrag „Leuchfeuer des Nordens“ NGGG, Hamburg
„Funktionelle Analysen zur Proliferationshemmung und
Apoptoseinduktion chemoresistenter Ovarialkarzinomzellen
durch den TNF-Liganden TRAIL“
- September 2008
Posterveröffentlichung auf dem Kongress der Deutschen
Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hamburg
- August 2009,
Translational Oncology,
18;2(3):164-73
Karen Bräutigam, Dirk Olaf Bauerschlag, Marion Tina
Weigel, Julia Biernath-Wüpping, Thomas Bauknecht,
Norbert Arnold, Nicolai Maass, Ivo Meinhold-Heerlein
- „Combination of Enzastaurin and Pemetrexed Inhibits Cell
Growth and Induces Apoptosis of Chemoresistant Ovarian
Cancer Cells Regulating Extracellular Signal-Regulated
Kinase 1/2 Phosphorylation ”
- September 2010,
Journal of Cancer Research and
Clinical Oncology
DOI 10.1007/s00432-010-0952-2
Karen Bräutigam, Julia Biernath-Wüpping, Dirk O.
Bauerschlag, Constantin S. von Kaisenberg, Walter Jonat,
Nicolai Maass, Norbert Arnold, Ivo Meinhold-Heerlein
- „Combined treatment with TRAIL and PPAR ligands
overcomes chemoresistance of ovarian cancer cell lines“

Sonstige Tätigkeiten:

- Februar, 2007
aktives Mitglied des Rotaract Club Kiel
- 2008-2009
Sport
Präsidentin des Rotaract Club Kiel
Halbmarathon Läufe, alpin Skifahren, Lacrosse, Ballett