

Institut für Experimentelle Tumorforschung

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

***In vitro* und *in vivo* Untersuchungen der Wirkung
eines neuen rekombinanten TRAIL-Rezeptor-Agonisten
auf Pankreasadenokarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Karen Legler

aus Schwerin

Kiel, Juli 2017

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold
Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2018
Zum Druck genehmigt: 18.05.2018

gez. _____ Dekan

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	6
I. Zusammenfassung.....	9
II. Summary.....	11
1. Einleitung	13
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	13
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	13
1.2.2 Diagnose und Therapie	14
1.3 Das TRAIL/ TRAIL-Rezeptor-System.....	15
1.3.1 TRAIL und seine Rezeptoren	16
1.3.2 Der TRAIL-vermittelte apoptotische Signalweg.....	17
1.3.3 TRAIL-Resistenz	19
1.3.4 TRAIL-vermittelte nicht-apoptotische Signalwege.....	19
1.3.5 Die Rolle von TRAIL-Rezeptoren bei der Malignität von Tumorzellen.....	20
1.3.5 Klinische Entwicklung der TRAIL-basierten Tumorthherapie	21
1.4 APG350 - Eine neue rekombinante Form von TRAIL.....	26
1.5 Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Chemikalien.....	28
2.1.2 Kits	31
2.1.3 Retrovirale Vektoren.....	31
2.1.4 verwendeter Bakterienstamm	32
2.1.5 Oligonukleotide.....	32
2.1.6 Antikörper	32
2.1.7 Medien und Zusätze	33
2.1.8 Puffer und Lösungen	34
2.1.9 Verwendete Zellen.....	35
2.1.10 Verwendete Substanzen.....	36
2.1.11 Medikamente für Tierversuche	36
2.1.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	37
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Zellbiologische Methoden	41
2.2.1.1 Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	41
2.2.1.2 Zählen und Aussäen von Zellen	42
2.2.1.3 Dosis-Wirkungs-Kurven	42

2.2.1.4 Kristallviolett-Färbung	43
2.2.1.5 Zytotoxizitätstest (MTS-Tetrazolium-Assay).....	43
2.2.1.6 Interleukin-8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (IL-8 ELISA)	44
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	44
2.2.2.1 Isolierung und Vervielfältigung von Plasmid-DNA	44
2.2.2.2 Herstellung stabiler Colo357 Bcl-xL-Zellen	45
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	46
2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Ganzzell-Lysaten	46
2.2.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe	46
2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (Pierce-Assay)	47
2.2.3.4 Western Blot.....	47
2.2.4 Immunhistochemische Methoden	48
2.2.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten an kryokonserviertem Material	48
2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung an kryokonserviertem Material.....	48
2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung an kryokonserviertem Material.....	49
2.2.4.4 Herstellung von Gewebeschnitten an formalinfixiertem Paraffinmaterial	49
2.2.4.5 Immunhistochemische Färbung an formalinfixiertem Paraffinmaterial	49
2.2.5 Tierversuche.....	50
2.2.5.1 Versuchstierhaltung	50
2.2.5.2 Orthotopes Xenotransplantationsmodell	51
2.2.5.3 Primäres Tumormodell mit konservativer Therapie	52
2.2.5.4 Resektionsmodell mit adjuvanter Therapie	52
2.2.5.6 Bestimmung des APG350- und TRAIL-Spiegels im Serum von SCID bg Mäusen	54
2.2.5.7 Statistische Auswertung und Prüfung auf Signifikanz	54
3. Ergebnisse	55
3.1 <i>in vitro</i> -Analysen	55
3.1.1 APG350 induziert Apoptose in PDAC-Zellen.....	55
3.1.2 Überexpression von Bcl-xL schützt PDAC-Zellen vor APG350-vermittelter Apoptose	61
3.1.3 APG350 induziert nicht-apoptotische Signalwege in PDAC-Zellen.....	65
3.1.4 APG350 induziert IL-8 in PDAC-Zellen	68
3.2 <i>in vivo</i> -Analysen	72
3.2.1 Einfluss der konservativen APG350-Therapie auf PDAC-Tumore und die Metastasierung	72
3.2.1.1 APG350 reduziert das Gewicht der PDAC-Primärtumore.....	72

3.2.1.2 Bcl-xL-Überexpression schützt PDAC-Tumore vor APG350-vermittelter Apoptose	76
3.2.1.3 Einfluss der konservativen APG350-Therapie auf die Metastasierung	84
3.2.2 Einfluss der adjuvanten APG350-Therapie auf PDAC-Rezidive und Metastasierung	85
3.2.2.1 APG350 reduziert das Gewicht der PDAC-Rezidivtumore.....	85
3.2.2.2 Expression von TRAIL-R 1 und TRAIL-R 2 in PDAC-Tumoren	87
3.2.2.3 Überexprssion von Bcl-xL führt nicht zur APG350-vermittelten Apoptose in PDAC-Rezidiven.....	89
3.2.2.4 Adjuvante APG350-Therapie reduziert signifikant die Lebermetastasen	91
4. Diskussion.....	93
5. Ausblick und Fazit	104
6. Literaturverzeichnis	105
7. Anhang.....	120
8. Darstellungsverzeichnis.....	122
9. Danksagung	124
10. Lebenslauf.....	125
11. Publikationen.....	126
12. Erklärung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
Aqua dest	Aqua destillata
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra large
Bid	Bcl-2 homology domain 3 interacting domain death agonist
BSA	Bovine Serum Albumin
BV	Bevacizumab
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caspase	Cysteiny-aspartate specific protease
CD95	Cluster of differentiation 95
cFlip	cellular FLICE (FADD-like 1L-1β-converting enzyme) inhibitory protein
CRC	colorectal cancer
CX	Cetuximab
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DcR1	Decoy-Receptor 1
DcR2	Decoy-Receptor 2
DD	death-domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline
DR4	Death Receptor 4
DR5	Death Receptor 5
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ERK	extracellular regulated kinase
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	hours (Stunde)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGA2	High mobility group A2
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IKK	inhibitor of NF- κ B kinase
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
I κ B α	inhibitor of NF- κ B α
i.p.	Intraperitoneal
IVC	individually ventilated cages
JNK/ SAPK	c-Jun N-terminal kinases/ stress-activated protein kinases
kDa	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
KRAS	Kirsten Rat sarcoma
LB-Medium	Lysogeny Broth
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinases
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1 protein
min	Minute
mM	Millimolar
MM	Multiple myeloma
NF- κ B	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NSCLC	non-small cell lung cancer
OPG	Osteoprotegerin
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidene difluoride

RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
Ras	Rat sarcoma protein
RIP1	receptor interacting protein 1
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	seconds (Sekunde)
Smac/ DIABLO	second mitochondria- derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low PI
SPF	spezifisch pathogenfrei
tBid	trunkiertes Bid
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween
TNF-SF	Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TRAF-2	TNF-receptor associated factor-2
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R1	TRAIL-Rezeptor 1
TRAIL-R2	TRAIL-Rezeptor 2
TRAIL-R3	TRAIL-Rezeptor 3
TRAIL-R4	TRAIL-Rezeptor 4
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

I. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8% zu den fatalen malignen Krebserkrankungen. Laut einer unlängst veröffentlichten Hochrechnung für die USA wird im Jahre 2030 das Pankreaskarzinom auf die zweite Stelle der krebisbedingten Todesfälle vorrücken. Der einzige kurative Therapieansatz ist bisher die chirurgische Resektion des Karzinoms, wobei dies nur bei 10 - 15 % der Patienten nach Diagnosestellung durchführbar ist. Strahlen- und Chemotherapie werden nach Tumorresektion oder beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom angewandt. Da die Tumore oftmals therapieresistent sind, ist diese Form der Therapie wenig erfolgversprechend. Somit ist eine Entwicklung von neuen Therapieansätzen für die Behandlung des Pankreaskarzinoms dringend erforderlich.

Der TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) kann über die Bindung an seine membranständigen Todesrezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, Apoptose in Krebszellen, nicht jedoch in transformierten Zellen, auslösen. Hierfür werden gegenwärtig agonistische, Rezeptor-spezifische Antikörper in klinischen Studien für die Behandlung verschiedener Tumorentitäten erprobt. Allerdings zeigen viele Tumorzellen Resistenzen gegenüber der apoptotischen TRAIL-Wirkung und weisen verstärkt TRAIL-vermittelte nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Effekte auf.

Eine aussichtsreiche Therapiemöglichkeit bietet eine neue rekombinante Form von TRAIL, das APG350. In ersten Untersuchungen an Brust-, Hirn-, Lungen- und Kolontumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass dieser hexamere TRAIL-Rezeptor-Agonist effektiv den Zelltod in Tumorzellen durch die Multimerisierung der TRAIL-Rezeptoren an der Plasmamembran auslöst. Die Wirkung von APG350 auf Pankreasadenokarzinomzellen ist bisher nicht bekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* und *in vivo* untersucht.

In den *in vitro* Versuchen konnte bei identischer massenbezogener Konzentration der Substanzen gezeigt werden, dass hexameres APG350, genauso effektiv wie trimeres TRAIL, die apoptotische Signalkaskade in PancTul-Zellen induzierte. Dagegen führte die Stimulation der Panc89- und Colo357-Zellen mit hexameren APG350 zur schwächeren Induktion der Apoptose als trimeres TRAIL. Beide Substanzen induzierten in gleichem Ausmaß Apoptose in der Apoptose-resistenten Zelllinie Colo357 Bcl-xL, jedoch war die Ausprägung der Apoptose im Vergleich zur parentalen Colo357-Zelllinie signifikant verringert. Parallel zu der Aktivierung des apoptotischen Signalweges, wurden durch trimeres TRAIL auch nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Signalwege induziert. Der Vergleich von den zwei TRAIL-Varianten bei gleicher massenbezogener Konzentration zeigt, dass das hexamere

APG350 weniger stark die Signalwege p38, JNK und NF- κ B in Panc89- und Colo357-Zellen induziert. In diesen Zellen wurde auch eine verminderte IL-8-Induktion durch APG350 nachgewiesen.

In den *in vivo* Untersuchungen in einem orthotopen Xenograft-Transplantationsmodell an SCID beige Mäusen zeigt sich, dass die Behandlung mit hexameren APG350 das Wachstum von primären PancTul- bzw. Colo357-Tumoren signifikant reduzierte. Die Therapie mit APG350 verringerte ebenfalls signifikant das Wachstum von PancTul-Rezidivtumoren und reduzierte weiterhin die Anzahl der Colo357-Vektor-Rezidivtumore in den Mäusen. Demgegenüber konnte keine Reduktion in den Apoptose-resistenten Colo357 Bcl-xL-Tumoren, weder im Primärtumorwachstum noch im Rezidivtumorwachstum, erzielt werden. In allen durchgeführten *in vivo* Experimenten führte die APG350-Behandlung zur Verminderung der Lebermetastasierung.

Zusammenfassend stellt die Behandlung mit dem neuen hexavalenten TRAIL-Rezeptor-Agonisten APG350 ein vielversprechender Ansatz für die Eliminierung von Apoptose-sensitiven und von Apoptose-resistenten geringe Mengen an Bcl-xL-exprimierenden Pankreaskarzinom-Zellen dar. Weiterhin führt APG350 zur verminderten Aktivierung nicht-apoptotischer, pro-inflammatorischer Signalwege in Pankreaskarzinom-Zellen und zur Reduktion der Lebermetastasierung in den durchgeführten orthotopen Xenograft-Versuchen mit Apoptose-sensitiven und Apoptose-resistenten Pankreaskarzinom-Zellen.

II. Summary

The pancreatic ductal adenocarcinoma is one of the most malignant cancer disease with a 5-year survival rate of 8 %. According to a recently published projection for the Unites States, pancreatic cancer deaths become the second leading causes of cancer-related death in 2030. The only curative therapy is still the surgical resection of the tumor, but this can only be performed in 10 - 15 % of the patients. Radio- and chemotherapy are applied after tumor resection or for advanced pancreatic tumors. However, the effects of this form of therapy are limited because of tumor resistance. Thus, development of new therapeutic approaches is urgently needed for the treatment of pancreatic cancer.

The TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces to its membrane bound death receptors, TRAIL-R1 and TRAIL-R2, apoptosis in tumor cells but not in transformed cells. Therefore, a recombinant form of soluble TRAIL and agonistic antibodies that specifically target TRAIL-R1 or TRAIL-R2 are tested in clinical trials for the treatment of different tumor entities. Unfortunately, a wide range of tumor cells show resistance to TRAIL-therapy and exhibit TRAIL-induced non-apoptotic, pro-inflammatory signaling.

The novel recombinant form of TRAIL, APG350, offers a promising treatment option. First study on brast-, brain-, lung- and coloncarcinom cell lines showed that this hexavalent TRAIL receptor agonist induces cell deth effectively in tumor cells by multimerization of TRAIL receptors on the plasma membrane without additional crosslinking. The effect of APG350 on pancreatic tumor cell lines is unknown so far and has been investigated in the present study *in vitro* and *in vivo*.

The *in vitro* studies reveal that hexameric APG350 induces apoptosis similar to trimeric TRAIL by identical mass concentration in PancTul-cells. In contrast, stimulation of Panc89- and Colo357-cells with trimeric TRAIL led to an emended induction of apoptosis as hexameric APG350. With respect to tumor cell lines with different sensitivity, both TRAIL-variants induce apoptosis in the same range in resistant Colo357 Bcl-xL cells, but this induction was significantly reduced in comparision to Colo357 cells. It was observed that in parallel to the activation of the signaling pathway, trimeric TRAIL induces also non-apoptotic, pro-inflammtory signaling pathways. Comparing the two TRAIL-variants by uniform mass concentration, hexameric APG350 induces signaling pathway p38, JNK and NF-κB less stronger than trimeric TRAIL in Panc89- and Colo357-cells. In these cells a decreased IL-8 induction was detected by APG350.

Studies in orthotopic xenograft transplantation model of SCID beige mice show that the treatment with hexameric APG350 significantly reduces the growth of primary PancTul- and

Col357 vector-tumors. Therapy with APG350 also decreases the growth of PancTul-recurrent tumors and furthermore the number of Colo357 vector-recurrent tumors in mice. In contrast to that, no reduction in apoptotic-resistant Bcl-xL-overexpressing Colo35-tumors, neither in primary growth nor in recurrent tumor growth, can be achieved. However, APG350 treatment led to a reduction of liver metastases in all performed *in vivo* experiments.

In summary, treatment with the hexavalent TRAIL receptor agonist APG350 represents a promising therapeutic agent for the elimination of apoptotic-sensitive tumor cells and apoptotic-resistant tumors cells with low Bcl-xL-expression. Furthermore, APG350 leads to a reduced activation of non-apoptotic pro-inflammatory signaling in pancreatic cancer cells and diminish liver metastases in orthotopic xenograft experiments with sensitive and resistant pancreatic cancer cell lines.

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Hinsichtlich der funktionellen Differenzierung der Malignome des Pankreas wird zwischen exokrinen und endokrinen Pankreastumoren unterschieden. 95 % aller Pankreastumore entstehen aus dem exokrinen Teil des Pankreas (Klinke et al., 2005). Von den exokrinen Tumoren kommen duktale Adenokarzinome (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) mit ca. 95 % am häufigsten vor. Die anderen 5 % sind den muzinös-zystischen Tumoren zuzuordnen (Seufferlein et al., 2013).

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland über 16.000 Männer und Frauen am duktalem Pankreaskarzinom. Da die Mehrzahl der befallenen Patienten an dieser Erkrankung verstarben, ist die Inzidenzrate nahezu mit der Sterberate gleichzusetzen (Robert Koch-Institut, 2013). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei 8 %. Somit weist das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen auf. Diese Krebsart ist die vierthäufigste Todesursache und das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt für Männer bei 71 und für Frauen bei 75 Jahren (Robert Koch-Institut, 2013).

Laut Statistik des Robert Koch-Institutes von 2013 wird die Zahl der Neuerkrankten in den nächsten Jahrzehnten weiter steigen. Die Fachzeitschrift *Cancer Research* veröffentlichte jüngst die Prognose, dass das Pankreaskarzinom im Jahre 2030 in den USA auf Platz zwei der krebisrelevanten Todesursachen noch vor Leber-, Kolon- und Brustkrebs in Erscheinung treten könnte (Rahib et al., 2014).

Als Risikofaktoren sind Lebensgewohnheiten wie exzessiver Alkohol- und Tabakkonsum zu nennen, die die Entwicklung des Pankreaskarzinoms begünstigen können (Talamini et al., 1999; Talamini et al., 1999; Nilsen et al., 2000; Ye et al., 2002; Duell et al., 2002; Villeneuve et al., 2004; Larsson et al., 2005; Brown, 2005). Desweiteren ist bekannt, dass chronische Pankreaserkrankungen (chronische Pankreatitis), Fettleibigkeit (Adipositas) und Diabetes mellitus Typ 2 mit dieser Krebsart assoziiert sind (Michaud et al., 2001; Larsson et al., 2005; Patel et al., 2005; Rapp et al., 2005; Chari et al., 2005). Darüberhinaus belegen mehrere Studien, dass genetische Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung eines Karzinoms haben und gehäuft Mutationen des *KRAS* Oncogens und der Tumorsuppressorgene *P53*, *P16*- und *DPC4/SMAD4* in PDAC vorkommen (Moore et al., 2001; Jaffee et al., 2002; Sipos et al., 2003).

1.2.2 Diagnose und Therapie

Trotz neuer und verbesserter therapeutischer Verfahren in der molekularen und klinischen Onkologie, ist die Überlebensrate für Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas besonders gering. Das Erkennen der Krankheit im frühen Stadium erweist sich als schwierig, da die bösartige Neubildung keine bzw. nur unspezifische Symptome verursacht (Robert Koch-Institut, 2013).

Die einzige kurative Therapie beim PDAC ist die chirurgische Operation mit dem Ziel einer R0-Resektion (Doi et al., 2008). Allerdings ist diese nur im Falle von 10 bis 15 % der Patienten möglich (Lim et al., 2003). Darüber hinaus entwickeln 80 % der operierten Patienten eine Rezidivkrankung (Bilimoria et al., 2007). Daher liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach erfolgter Resektion des Tumors bei ca. 20 % (Wagner et al., 2004). Eine späte Diagnosestellung, die daraus folgende geringe kurative Resektionsrate sowie eine frühzeitige Metastasierung verschlechtern die Prognose der Pankreaskarzinompatienten.

Nach R0 Resektion gilt eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine bzw. 5-FU (5-Fluorouracil) als Therapiestandard für das Pankreaskarzinom (Neoptolemos et al., 2004; Oettle et al., 2007). Jedoch kann damit das Gesamtüberleben der Patienten nicht verbessert werden (Goldstein et al., 2015; Petrioli et al., 2015).

Beim lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom wird eine Radiotherapie mit Gemcitabin bzw. 5-FU oder eine Chemotherapie als Einzelgabe empfohlen (Burris et al., 1997; Yip et al., 2006). Für das metastasierte Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass Gemcitabin in Kombination mit den Medikamenten Elortinib bzw. Nab-Pacitaxel das Gesamtüberleben im Vergleich zur Monotherapie um ca. 2 Monate verlängerte (Moore et al., 2007; Hoff et al., 2013; Goldstein et al., 2015). Der Einsatz von FOLFIRINOX (Kombination aus 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) für eine palliative Therapie ist umstritten, da Patienten zwar vereinzelt von der Behandlung profitieren, jedoch dies auch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist (Conroy et al., 2011). Zusammenfassend sind neue Therapieansätze für die Behandlung des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas dringend erforderlich.

1.3 Das TRAIL/ TRAIL-Rezeptor-System

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gehört zur TNF-Superfamilie. Mitglieder dieser Superfamilie, wozu auch *Cluster of differentiation 95* (Fas-/Apo-1)-Ligand (CD95L/ FasL/ Apo-1L) und *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) gehören, besitzen vielfältige biologische Aufgaben. Sie sind unter anderem an der Co-Stimulation von T-Zellen, der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen sowie an der Makrophagenaktivierung beteiligt (Beutler et al., 1994, Smith et al., 1994, Gruss et al., 1995). Darüber hinaus regulieren diese Moleküle durch die Aktivierung des programmierten Zelltods die Eliminierung von unerwünschten Immunzellen. Die TNF-SF-Mitglieder werden von differenzierten Lymphozyten exprimiert und sind als wichtige Mediatoren der Apoptose bei der Regulation der Immunantwort unumgänglich (Smyth et al., 2003).

Eine best untersuchte Form des programmierten Zelltods ist die Apoptose. Die Apoptose kann durch zwei verschiedene Signalwege, den intrinsischen und den extrinsischen, eingeleitet werden. Ersterer wird beispielsweise bei DNA-Schäden in der Zelle über die Regulation von intrazellulären Molekülen der *B-cell lymphoma-2*-(Bcl-2)-Familie initiiert. Der extrinsische Apoptosesignalweg wird über die sogenannten Todesrezeptoren auf der Plasmamembran eingeleitet.

In den 90er Jahren wurde große Hoffnung in das Molekül TNF- α als potentiell Antitumortherapeutikum gelegt, da es Apoptose und Nekrose in einigen Tumorzellen auslöst. Jedoch induzierte die systemische Applikation von TNF- α auch sehr starke, unerwünschte Effekte, wie Hepatotoxizität und Hypotonie (Creagan et al., 1988; Roberts et al., 2011).

Aufgrund der effektiven Induktion von Zelltod in Tumorzellen stellte der Ligand CD95 ein vielversprechendes Molekül für die Krebstherapie dar. Allerdings hat sich herausgestellt, dass die systemische Applikation von CD95L zu einer letalen Schädigung humaner Hepatozyten führte (Ogasawara et al., 1993).

Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben bewiesen, dass eher die Blockierung von TNF- α bzw. von CD95L eine vielversprechendere Therapieoption zu sein scheint, als die Aktivierung dieser.

Interessanterweise wurde das TNF/ TNF-R- und CD95/ CD95L-System im letzten Jahrzehnt vermehrt Gegenstand intensiver Forschungen, da die Inhibition von CD95L vielversprechende Ansätze in der Krebstherapie darstellen (Balkwill, 2009; Tuettenberg et al., 2012; Wick et al., 2014).

1.3.1 TRAIL und seine Rezeptoren

TRAIL, auch Apo2L genannt, wurde ursprünglich aufgrund seiner Sequenzhomologie der extrazellulären Domäne zu CD95L (28 % identisch) und zu TNF (23 % identisch) identifiziert (Wiley et al., 1995, Pitti et al., 1996). TRAIL ist ein Typ-II Membranprotein, welches aus 281 Aminosäuren in der humanen und 291 Aminosäuren in der murinen Form besteht. Diese sind 65 % homolog zueinander. Das TRAIL-Gen ist auf dem Chromosom 3 an der Position 3q26 lokalisiert (Wiley et al., 1995). Das Protein kommt membrangebunden und löslich vor. Das lösliche Protein besitzt eine Größe von 28 kDa, während das native Molekül als multimere Form ein Molekulargewicht von zirka 80 kDa aufweist (Wiley et al., 1995).

TRAIL wird in verschiedenen Gewebetypen von Immunzellen, vor allem B-Zellen, T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert und dient dazu, krankhafte Zellen durch das Einleiten des programmierten Zelltods zu eliminieren (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996).

TRAIL kann an vier membranständige Rezeptoren binden. Zwei dieser Rezeptoren werden TRAIL-R1 (DR4) (Pan & O'Rourke et al., 1997) und TRAIL-R2 (DR5) (Pan & Ni et al., 1997, Sheridan et al., 1997, Walczak et al., 1997, Wu et al., 1997) genannt und sind in der Lage, Apoptose auszulösen, weshalb sie auch als Todesrezeptoren bezeichnet werden. Wie bei allen Todesrezeptoren, besitzen auch diese eine intrazelluläre Todesdomäne (*death-domain*, DD). Diese Molekül-Molekül-Interaktionsdomäne, bestehend aus sechs bis sieben α -Helices, ist für die Apoptoseinduktion essentiell (Lahm et al., 2003).

TRAIL-R3 (DcR1) (Degli-Esposti et al., 1997; Pan & Ni, et al., 1997; Sheridan et al., 1997) und TRAIL-R4 (DcR2) (Degli-Esposti et al., 1997; Marsters et al., 1997) besitzen keine DD und können daher die Apoptose nicht auslösen. Sie werden auch Decoy-Rezeptoren genannt, weil sie durch die kompetitive TRAIL-Bindung die TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-vermittelte Apoptose hemmen können.

TRAIL-R3 ist ohne intrazelluläre Domäne und mittels Glykosylphosphatidylinositol-(GPI-) Anker in der Zellmembran verankert. Der TRAIL-R4 hat eine verkürzte, nicht funktionale zytoplasmatische DD. *Degli-Esposti et al.* haben gezeigt, dass dieser Rezeptor den *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*-(NF- κ B)-Signalweg aktiviert und Tumorzellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose schützen kann (Degli-Esposti et al., 1997).

Neben der Bindung an die Plasmamembranrezeptoren kann TRAIL auch an einen löslichen Rezeptor namens Osteoprotegerin (OPG) binden. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenentstehung und wurde zunächst als Rezeptor für den *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL) identifiziert. Jedoch konnten *Emery et al.* zeigen, dass OPG auch die Fähigkeit besitzt den TRAIL zu binden (Emery et al., 1998).

1.3.2 Der TRAIL-vermittelte apoptotische Signalweg

Die am besten charakterisierte Funktion von TRAIL ist die Induktion der Signalkaskade, an deren Ende der programmierte Zelltod eingeleitet wird. Wie auch bei anderen TNF-SF Mitgliedern kann TRAIL Homotrimere formen, die drei Rezeptoren binden können. Das Zink-Atom, welches durch Cysteine im trimeren Liganden verknüpft wird, ist für die Stabilisierung des Trimers und demnach für eine optimale biologische Aktivität fundamental (Bodmer et al., 2000). Trimerisiertes TRAIL bindet an der Zelloberfläche TRAIL-R1 sowie TRAIL-R2 und führt damit zur Homo- oder Heterotrimerisierung der Todesrezeptoren, was in Kosequenz die Entstehung des sogenannten *death-inducing signaling complex* (DISC) einleitet. Die nun geclusterten Todesdomänen der TRAIL-Rezeptoren rekrutieren jetzt das *Fas-associated death domain protein* (FADD) und die sogenannten Initiatorcaspasen (Caspase-8/-10). FADD besitzt auch eine *death effector domain* (DED), welche an die DED von cysteinylabhängigen aspartatspezifischen Proteasen (Caspasen) bindet. Die aktivierten Caspasen-8 und -10 spalten sich autokatalytisch in große und kleine Untereinheiten. Diese bilden Heterotetramere, die die Effektorcaspasen-3 und -7 aktivieren. Die Caspase-3 und -7 werden gespalten und induzieren somit den Zelltod (Falschlehner et al., 2007). Dieser Signalweg wird von sogenannten Typ-I-Zellen genutzt, in denen die über die DISC-Bildung aktivierte Menge von Caspase-8 für die Auslösung der Apoptose ausreicht (Abbildung 1.2). Im Gegensatz dazu benötigen sie sogenannten Typ-II-Zellen die Verstärkung des initialen Signals durch die Aktivierung der Mitochondrien. In diesen Zellen reicht die geringe DISC-Formierung nicht aus, um Caspase-8/-10 zu aktivieren.

Die Einteilung der Zellen in Typ-I/ Typ-II gilt sowohl für das CD95- als auch für das TRAIL-System (Scaffidi et al., 1998; Özören et al., 2002). Eine bedeutende Rolle spielt das Protein *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP), welches in Typ-II-Zellen stark vorhanden ist und die Aktivierung von Caspase-3 inhibiert. Somit ist in diesen Zellen die Induktion des mitochondrialen Apoptoseweges unumgänglich (Jost et al., 2009). In den Typ-II-Zellen führt die Aktivierung von Caspase-8 nach der Bindung des Liganden an die Todesrezeptoren zur Spaltung des zur proapoptotischen Bcl-2-Familie gehörenden *Bcl-2 homology domain 3 interacting domain death agonist* (Bid) zum verkürzten Bid (truncated Bid/ tBid). Folglich werden die proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder *Bcl-2 associated X protein* (Bax) und *Bcl-2 homologous antagonist/ killer* (Bak) aktiviert und damit die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert. Die Proteine Cytochrom C, *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) und *second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low PI* (Smac/ DIABLO) werden freigesetzt. Cytochrom C und Apaf-1 bilden im Zytosol einen Multiproteinkomplex, der die Caspase-9 aktiviert. Diese aktiviert die Caspase-3, was zum Tod der Zelle führt (Falschlehner et al., 2007).

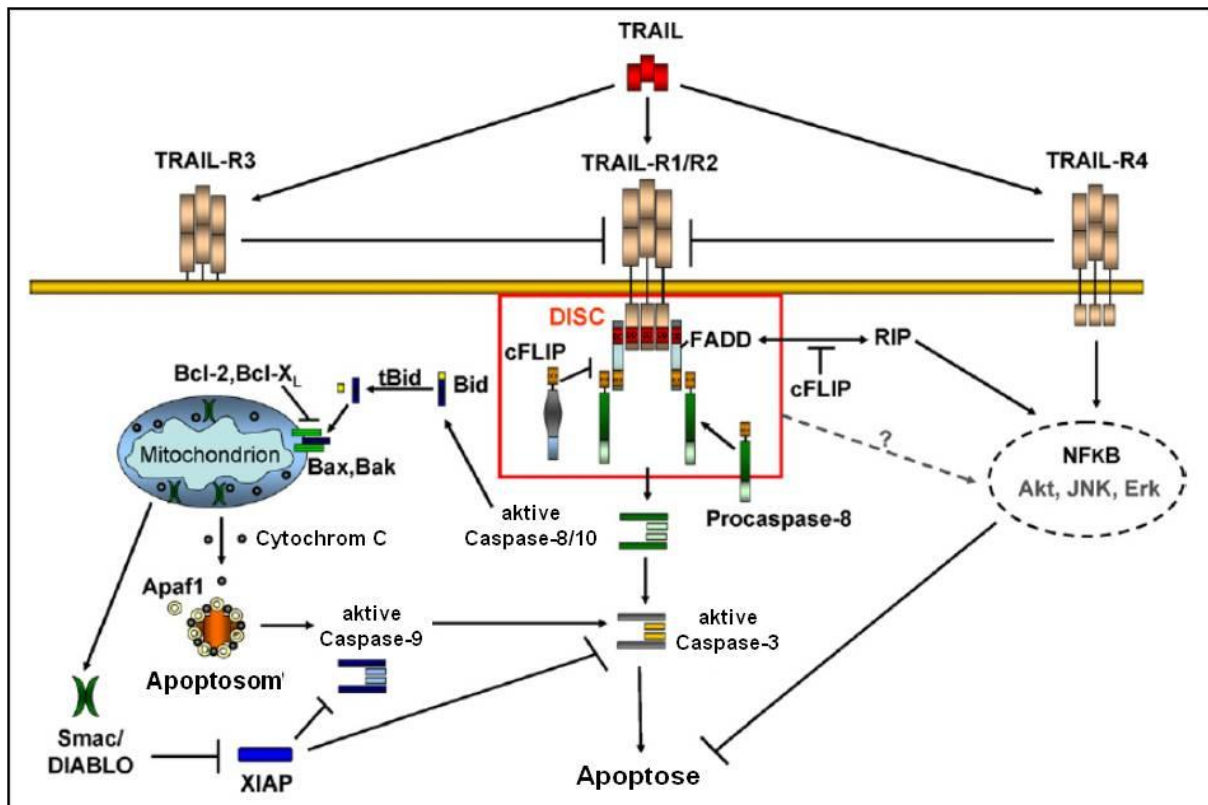


Abbildung 1.1: TRAIL-vermittelte Aktivierung des apoptotischen Signalweges.

TRAIL-Bindung an TRAIL-R1 und TRAIL-R2 rekrutiert FADD und Caspase 8. Weiterhin wird das anti-apoptotische Protein cFlip rekrutiert, das mit seiner DED an die DED von FADD binden kann und somit in Konkurrenz zu Caspase-8 und -10 steht. Der entstehende Multiproteinkomplex wird DISC genannt. DISC aktiviert die Caspasen-8 und -10, die autokatalytisch gespalten werden. Daraufhin werden die Caspasen-3 und -7 aktiviert und im autokatalytischen Prozess gespalten. Somit wird die Apoptose in Typ-I-Zellen eingeleitet. In Typ-II-Zellen spaltet Caspase-8 das proapoptotische Protein Bid. Gespaltenes Bid aktiviert an der äußeren Mitochondrienmembran die Proteine Bax und Bak, die wiederum die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran einleiten. Cytochrom C, Apaf-1 und Smac/DIABLO werden aus dem Intermembranraum freigelassen. Aus mehreren Cytochrom C und Apaf-1 Molekülen entsteht zusammen mit der Caspase-9 ein Multiproteinkomplex, das sogenannte Apoptosom. Caspase-3 und -7 werden gespalten und somit die Apoptose in diesem Zelltyp induziert. Neben der Aktivierung des apoptotischen Signalweges ist Caspase-8 in der Lage, nicht-apoptotische Signalwege (NF- κ B, JNK und ERK) zu aktivieren (Falschlehner et al., 2007).

Eine weitere Form des programmierten Zelltod ist die Nekroptose, die caspaseunabhängig abläuft. Die Nekroptose kann durch die Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren über die Bildung des Komplexes RIPK1/ RIPK3 (*activation of receptor-interacting protein kinase 1/3*) eingeleitet werden und findet parallel oder unabhängig von der Apoptose in Zellen statt (Bröker et al., 2005; Vandenabeele et al., 2010). Die Nekroptose stellt eine Alternative zum apoptotischen Signalweg dar, um in Tumorzellen mit geringer Menge an Caspasen, effektiv Zelltod auszulösen.

1.3.3 TRAIL-Resistenz

Untersuchungen zur TRAIL-Wirkung machten deutlich, dass eine Vielzahl von primären Tumorzellen und etablierten Tumorzelllinien resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind (Koschny et al., 2007). Infolgedessen wurde die TRAIL-Resistenz intensiv erforscht, und es stellte sich heraus, dass Resistenzmechanismen auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade vorkommen. Auf Plasmamembran-Ebene beeinflusst die Expression der TRAIL-Rezeptoren die Induktion der Apoptose. Eine Überexpression der Decoy-Rezeptoren schützt die Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose, da TRAIL mit hoher Affinität auch an diese Rezeptoren binden kann (Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997). Darüberhinaus kann TRAIL-R4 an beide Todesrezeptoren binden und somit die Entstehung des aktiven DISC hemmen. Ein weiterer Mechanismus der TRAIL-Resistenz stellt die eine erhöhte *cellular FLICE inhibitory protein* (cFlip-)-Expression und die damit verbundene Inhibierung der Initiatorcaspasen (Irmeler et al., 1997; Kim et al., 2000; Ganten et al., 2004; Geserick et al., 2008). Außerdem konnte in manchen Zellen eine verminderte Expression von Caspase-8 als TRAIL-Resistenzmechanismus beschrieben werden (Hopkins-Donaldson et al., 2000). Auf mitochondrialer Ebene ist eine Überexpression von anti-apoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie, wie Bcl-2, Bcl-xL oder Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1 protein*), für die Inhibition der Apoptose verantwortlich (Hinz et al., 2000; Fulda et al., 2002; Taniai et al., 2004). Eine erhöhte XIAP-Expression ist ebenfalls ein beschriebener Mechanismus, wie die Zellen den TRAIL-vermittelten Zelltod entgehen. So wurde gezeigt, dass der XIAP-Antagonist Smac/ DIABLO Melanomzellen, die viel XIAP exprimieren, sensitivieren kann (Zhang et al., 2001).

1.3.4 TRAIL-vermittelte nicht-apoptische Signalwege

Es ist bekannt, dass TRAIL und seine Todesrezeptoren auch nicht-apoptische, pro-inflammatorische Signalwege aktivieren (Röder et al., 2011; Azijli et al., 2013). TRAIL-Behandlung kann zur zur Aktivierung von *extracellular regulated kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinases/ stress-activated protein kinases* (JNK/ SAPK), p38, NF- κ B, Proteinkinase C (PKC), Scr und Proteinkinase B (PKB)/ Akt führen (Trauzold et al., 2001; Trauzold et al., 2006; Siegmund et al., 2007; Azijli et al., 2013). Daraus resultiert eine erhöhte Expression von anti-apoptischen und pro-inflammatorischen Proteinen und folglich kommt es zu einer Hemmung der Apoptose sowie zu einer Steigerung der Proliferation, Migration und Invasion (Abbildung 1.2). *In vivo* konnte für apoptose-resistente PDAC-Zellen gezeigt werden, dass TRAIL eine Steigerung der Invasivität und Metastasierung hervorrufen kann (Trauzold et al., 2006; Ishimura et al., 2006; Hoogwater et al., 2010).

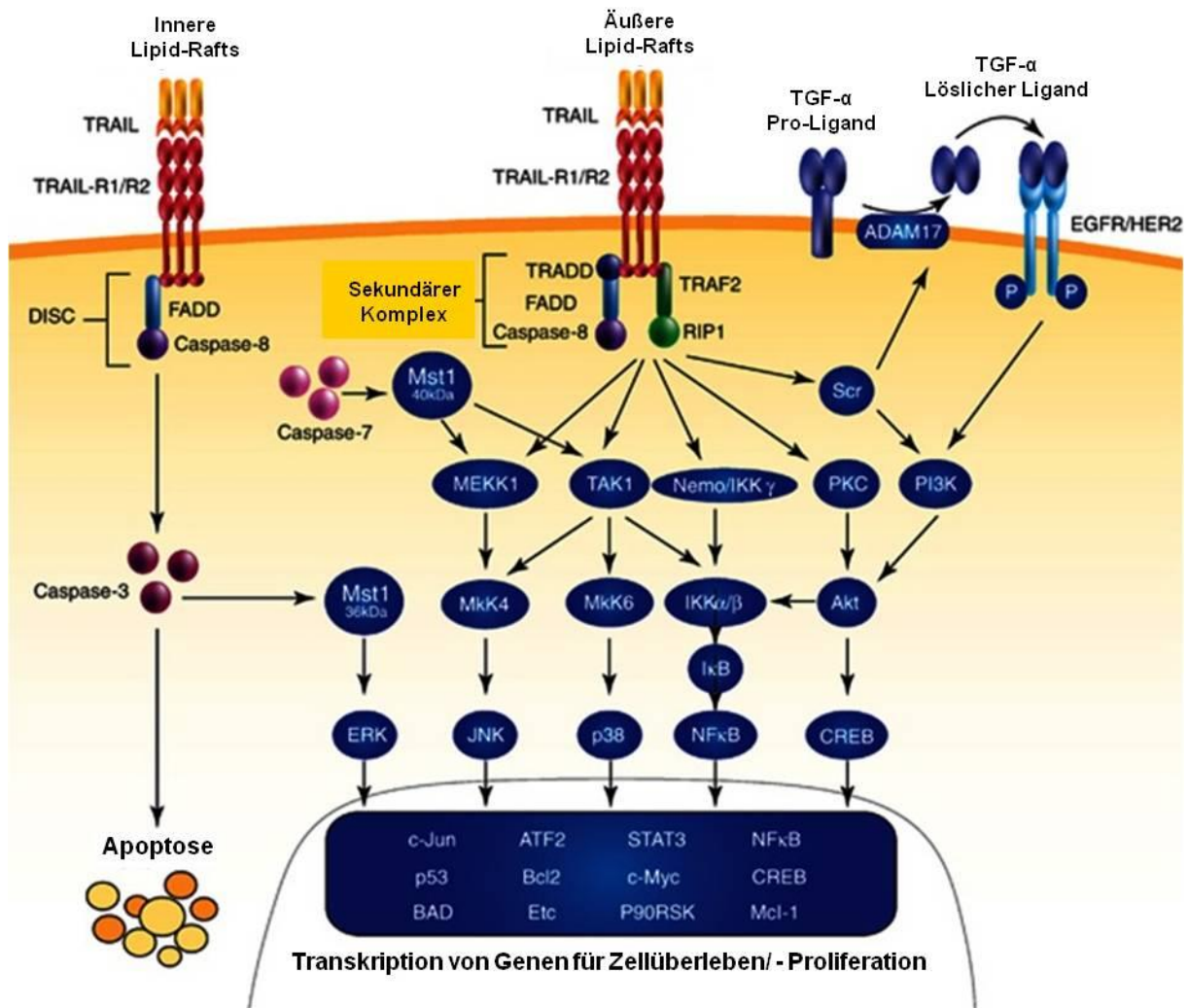


Abbildung 1.2: Aktivierung von nicht-apoptotischen, pro-inflammatorischen Signalwegen durch TRAIL.

Nach Bindung von TRAIL an die Rezeptoren R1 und R2 entsteht ein sekundärer Komplex mit TRAF-2, RIP1 und Nemo/ IKKγ. Es werden nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Signalwege über die Aktivierung von ERK, JNK und NF-κB induziert, die zu Inflammation, zum invasiven Wachstum und zur malignen Progression führen (Azijli et al., 2013).

1.3.5 Die Rolle von TRAIL-Rezeptoren bei der Malignität von Tumorzellen

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, sich zu einem malignen Phänotyp zu entwickeln, der mit einer gesteigerten Zellproliferation, der Umgehung von Apoptose und einer erhöhten Invasivität des Tumors einhergeht (Hanahan et al., 2011). Viele Tumorzellen sind gegen TRAIL-induzierte Apoptose resistent und insbesondere in solchen Zellen ist die Fähigkeit der Todesrezeptoren die pro-inflammatorische Signalwege zu induzieren, die die Invasion und Metastasierung fördern, von hoher Relevanz für die Tumorprogression (Röder et al., 2011; Azijli et al., 2013).

Interessanterweise zeigen die meisten Tumore wenig bis keine plasmamembranständige Expression der TRAIL-Rezeptoren auf, aber hohe intrazelluläre Mengen von meistens TRAIL-R2, aber auch TRAIL-R1 (Bertsch et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass die intrazelluläre Lokalisation einen Wachstumsvorteil oder einen anderen Nutzen für die Tumorzellen bietet.

Es stellte sich heraus, dass intrazelluläre TRAIL-Rezeptoren mit klinisch relevanten Parametern bei unterschiedlichen Tumorentitäten korrelieren. So konnte gezeigt werden, dass eine hohe intrazelluläre Expression den Krankheitsverlauf bei Mammakarzinom- bzw. Kolonkarzinompatienten begünstigt und auch zu einem längeren Gesamtüberleben bei Patienten mit einem Glioblastom führt (Sträter et al., 2002; Kuijlen et al., 2006; Ganten et al., 2009; Bavi et al., 2010). Für TRAIL-R2 ist beschrieben, dass eine hohe Expression mit einer schlechten Prognose für verschiedene Tumorentitäten assoziiert ist (Spierings et al., 2003; McCarthy et al., 2005; Cooper et al., 2008; Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Elrod et al., 2010; Haselmann et al., 2014; Karstedt et al., 2015). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine nukleäre Expression von TRAIL-R2 mit einer geringeren Überlebensrate bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom einhergeht und dieser Rezeptor eine protumorale Wirkung ausübt (Haselmann et al., 2014). Im Nukleus interagiert TRAIL-R2 mit dem Microprozessorkomplex Drosha/DGCR8 und seinen Interaktionspartnern p68, NF45 und hnRNPA1. Dabei kommt es zur Inhibition der Reifung der miRNA Let-7 und infolge dessen zum Anstieg der Level seiner Targets Lin28B und HMGA2 (Haselmann et al., 2014). Das *high mobility group A2* (HMGA2) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Pathogenese und der Progression von bösartigen Tumoren eine Rolle spielt. Es konnte für das Pankreaskarzinom eine hohe HMGA2-Expression nachgewiesen werden und diese hohen Level gehen mit einem hohen Tumorgrading, einem gesteigerten Lymphknotenbefall und einer schlechten Prognose für die Patienten einher (Hristov et al., 2009; Piscuoglio et al., 2012; Haselmann et al., 2014).

1.3.5 Klinische Entwicklung der TRAIL-basierten Tumorthherapie

Da TRAIL nach Interaktion mit den Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 spezifisch in Tumorzellen die Apoptose auslösen kann und nicht-transformierte Zellen dabei ausspart, ist die Entwicklung von TRAIL-Konstrukten für die Tumorthherapie in den Vordergrund getreten (Walczak et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999; Jo et al., 2000; El-Deiry, 2001; Schmaltz et al., 2002; Seki et al., 2003). Es wurden Konstrukte entwickelt, die entweder an beide Rezeptoren (rekombinantes TRAIL) oder spezifisch an TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 (agonistische TRAIL-Rezeptor spezifische Antikörper bzw. Muteine) binden und dadurch die apoptotische Signalkaskade einleiten kann. Die als TRAIL-Rezeptor-Agonisten zusammengefassten Substanzen werden ausgiebig als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie

getestet und sind Gegenstand von klinischen Studien der Phase-I und -II (Lemke et al., 2014; Abbildung 1.4).

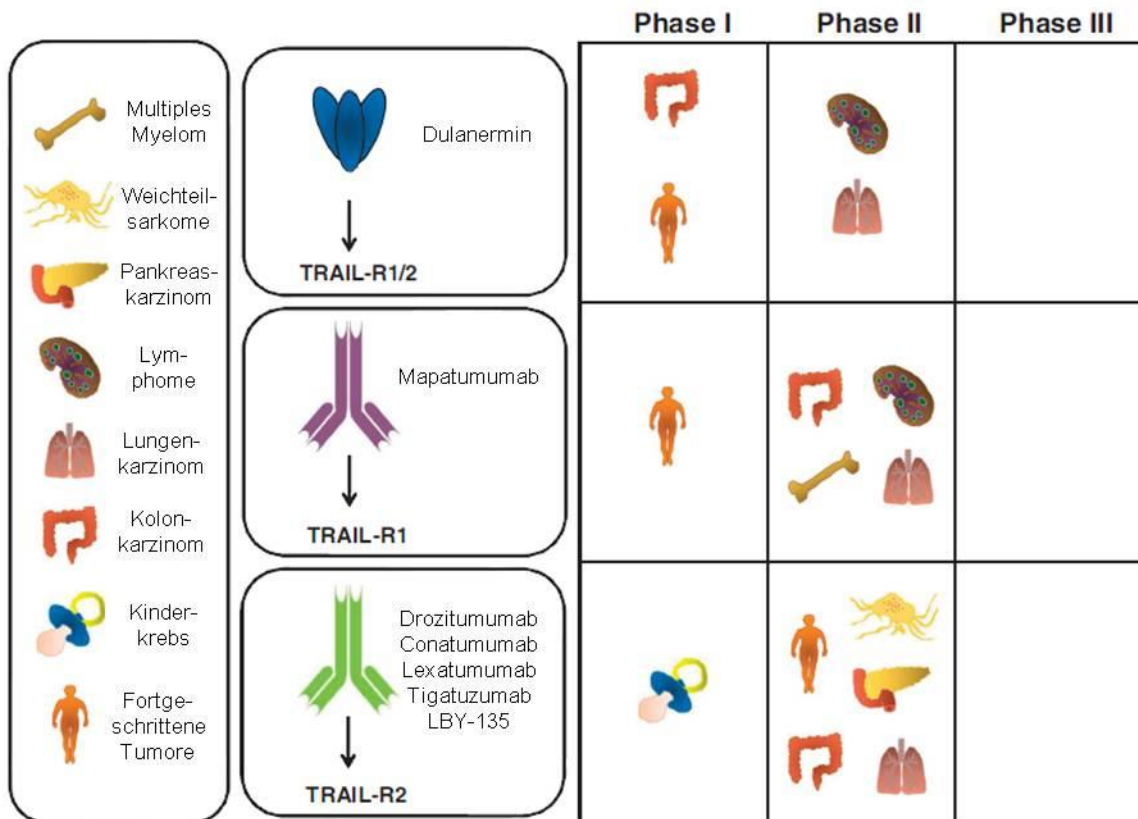


Abbildung 1.3: Klinischer Entwicklungsstand von TRAIL-Rezeptor-Agonisten in Phase-I und-II-Studien.

Dulanermin (rekombinantes TRAIL) und TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-spezifische Antikörper befinden sich in diversen Phase-I und -II-Studien. Die therapeutische Wirkung der beiden TRAIL-R2-spezifischen Antikörper Conatumumab und Tigatuzumab wurde für das Pankreaskarzinom in Phase-II-Studien erprobt (Lemke et al., 2014).

Die systemische Behandlung mit rekombinanten TRAIL hat den Vorteil, dass beide Todesrezeptoren gleichzeitig angesprochen werden und somit eine stärkere Apoptoseinduktion gewährleistet werden kann. Dies setzt jedoch voraus, dass die Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert vorkommen. Es wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der Todesrezeptoren in verschiedenen Tumorentitäten variiert und verschiedene Tumore offenbar unterschiedliche Präferenzen hinsichtlich der Nutzung des jeweiligen Rezeptors für die Auslösung der TRAIL-vermittelten Apoptose besitzen. Während in Lymphomzellen und PDAC-Zellen die Apoptose präferenziell über TRAIL-R1 läuft, wird die Signalkaskade in Kolon- bzw. Brustkrebszellen über TRAIL-R2 ausgelöst (Kelley et al., 2005; MacFarlane & Inoue et al., 2005; MacFarlane & Kohlhaas et al., 2005).

Die Autoren Walczak und Wilson zeigten, dass gute Antitumoreffekte mit rekombinanten TRAIL erzielt werden können und die Behandlung auch eine therapeutische Wirkung auf tumorumgebende Zellen besitzt (Walczak et al., 1999; Wilson et al., 2012). Der rekombinante lösliche TRAIL mit dem Namen Dulanermin ist das einzige Konstrukt, welches bisher in der Klinik zugelassen ist (Abbildung 1.4). Es enthält die TNF-homologe Domäne mit der extrazellulären Domäne des humanen löslichen TRAIL (Ashkenazi et al., 1999). In Phase-I-Studien hat sich das Dulanermin als eine nicht toxische und gut verträgliche Substanz mit hoher Ansprechrate für das Kolon- bzw. das Lungenkarzinom erwiesen (Soria et al., 2010; Wainberg et al., 2013). Dabei wurde deutlich, dass die positiven Effekte in Kombination mit Chemotherapie und dem monoklonalen *Vascular Endothelial Growth Factor* -(VEGF-) Antikörper Bevacizumab oder mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD20 namens Rituximab verstärkt werden. Dulanermin wurde bisher in zwei klinischen Phase-II-Studien für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (*non-small cell lung cancer/* NSCLC) und das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) getestet (Belada et al., 2010; Soria et al., 2011). Jedoch zeigte sich bei den behandelten Patienten keine signifikante Verbesserung bzw. Heilung der Erkrankung. Mit einer Halbwertszeit von zirka 30 min verbleibt Dulanermin deutlich kürzer im Körper als die monoklonalen Antikörper, deren Halbwertszeit zirka 14 - 21 Tagen betragen.

Der bis heute einzige TRAIL-R1-spezifische klinisch zugelassene Antikörper ist Mapatumumab (Abbildung 1.4). Als Einzeltherapie zeigte dieser Antikörper in mehreren Phase-I und -II-Studien ein gutes Verträglichkeitsprofil.

Darüberhinaus konnte bei Patienten mit Kolonkarzinom (*colorectal cancer/* CRC) und mit NSCLC ein stabiler Krankheitsverlauf erreicht werden (Greco et al., 2008; Hotte et al., 2008). Allerdings sprachen in einer Phase-II-Studie nur 3 von 40 Patienten mit NHL auf die Mapatumumab-Behandlung an (Younes et al., 2010).

Es existieren fünf TRAIL-R2-spezifische Antikörper: Drozitumumab, Conatumumab, Lexatumumab, Tigatuzumab und LBY-135. Diese werden in Phase-I und -II-Studien an Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten erprobt (Abbildung 1.4). Lexatumumab zeigt als Monotherapie einen stabilen Krankheitsverlauf ohne eine signifikante Reduktion des Tumors (Plummer et al., 2007). Eine Phase-II-Studie für das Pankreaskarzinom verdeutlicht, dass Conatumumab in Kombination mit dem Zytostatika Gemcitabine für die Patienten zwar gut verträglich ist, jedoch die schlechte Prognose nicht verbessert werden konnte (Kindler et al., 2012) (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Klinischer Entwicklungsstand der TRAIL-Rezeptor-Agonisten.

Rekombinantes TRAIL und agonistische anti-TRAIL-R1 und anti-TRAIL-R2 spezifische Antikörper wurden als Einzel- oder Kombinationstherapie für die Behandlung diverser Tumorerkrankungen getestet. CRC: kolorektales Karzinom; MM: multiples Myelom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphome; NSCLC: nichtkleinzelliges Lungenkarzinom; TRAIL: tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand; BV: Bevacizumab = Anti-VEGF; CX: Cetuximab = Anti-EGFR; Rituximab: Anti-CD20; RCT: Randomisierte Kontrollstudie; CR: complete response = vollständiges Ansprechen; PR: partial response = partielleres Ansprechen (modifiziert nach Lemke et al., 2014).

Phase	Tumorentität	Kombination	Probanden (n)/ Wirksamkeit	Referenz
Dulanermin (rhTRAIL/ AMG-951) - rekombinantes humanes TRAIL, bindet an TRAIL-R1 und TRAIL-R2				
I	Fortgeschrittene Tumore	-	71/ 2 Responder	Herbst et al., 2010
I	CRC	Chemo + BV	23/ 13 Responder	Wainberg et al., 2013
I	CRC	Chemo + BV	27/ 6 Responder	Kasubhai et al., 2013
I	CRC	Chemo + CX	30/ Keine Angabe	Yee et al., 2009
I	NSCLC	Chemo + BV	24/ 14 Responder (1 CR/ 13 PR)	Soria et al., 2010
I	NHL	Rituximab	7/ 3 Responder (2 CR/ 1 PR)	Yee et al., 2007
II (RCT)	NSCLC	Chemo + BV	213/ k. Aktivität	Soria et al., 2011
II (RCT)	NHL	Rituximab	48/ k. Aktivität	Belada et al., 2010
Mapatumumab (HGS-ETR1) - humaner monoklonaler Antikörper gegen TRAIL-R1				
I	Fortgeschrittener Tumor	-	49/ 0 Responder	Tolcher et al., 2007
I	Fortgeschrittener Tumor	-	41/ 0 Responder	Hotte et al., 2008
I	Fortgeschrittener Tumor	Chemo	49/ 12 Responder	Mom et al., 2009
I	Fortgeschrittener Tumor	Chemo	27/ 5 Responder	Leong et al., 2009
I/ II	NHL	-	40/ 3 Responder (2 CR/ 1 PR)	Younes et al., 2010
II	CRC	-	38/ 0 Responder	Trarbach et al., 2010
II	NSCLC	-	32/ 0 Responder	Greco et al., 2008
II (RCT)	MM	Bortezomib	104/ k. Aktivität	Belch et al., 2010
II (RCT)	Lunge	Chemo	109/ k. Aktivität	Pawel et al., 2014
Conatumumab (AMG-655) - humaner monoklonaler Antikörper gegen TRAIL-R2				
I	Fortgeschrittene Tumore	-	37/ 1 Responder	Herbst et al., 2010
I	Fortgeschrittener Tumor	-	18/ 0 Responder	Doi et al., 2011
I	Weichteilsarkome	Chemo	6/ 0 Responder	Demetri et al., 2012
I	Fortgeschrittene Tumore	Ganitumab	9/ 0 Responder	Chawla et al., 2010
I	NSCLC	Chemo	12/ 4 Responder (1 CR/ 3 PR)	Paz-Ares et al., 2009

I	CRC	Chemo	12/ 5 Responder	Saltz et al., 2009
I	Pankreaskarzinom	Chemo	13/ 4 Responder	Kindler et al., 2009
II (RCT)	Weichteilsarkome	Chemo	128/ k. Aktivität	Demetri et al., 2012
II (RCT)	NSCLC	Chemo	172/ k. Aktivität	Luis Paz-Ares et al., 2013
II (RCT)	Pankreaskarzinom	Chemo	83/ k. Aktivität	Kindler et al., 2012
II (RCT)	CRC	Chemo	103/ k. Aktivität	Cohn et al., 2013
II (RCT)	CRC	Chemo + BV	190/ k. Aktivität	Fuchs et al., 2013
Lexatumumab (HGS-ETR2) - humaner monoklonaler Antikörper gegen TRAIL-R2				
I	Fortgeschrittene Tumore	-	37/ 0 Responder	Plummer et al., 2007
I	Fortgeschrittene Tumore	-	31/ 0 Responder	Wakelee et al., 2010
I	Fortgeschrittene Tumore	Chemo	41/ teilweise Responder	Sikic et al., 2007
I	Kinderkrebs	-	24/ 0 Responder	Merchant et al., 2012
Tigatuzumab (CS-1008) - humanisierte Form des murinen monoklonalen TRAIL-R-Antikörpers TRA-8				
I	Karzinome/ Lymphome	-	17/ 0 Responder	Forero-Torres et al., 2010
II	Pankreaskarzinom	Chemo	61/ 8 Responder	Forero-Torres et al., 2013
II (RCT)	NSCLC	Chemo	97/ k. Aktivität	Reck et al., 2013
Droxitumab (PRO95780/ apomab) - humaner monoklonaler Antikörper gegen TRAIL-R2				
I	CRC	Chemo	9/ 2 Responder	Rocha Lima et al., 2012
I	Fortgeschrittene Tumore	-	50/ 0 Responder	Camidge et al., 2010
LBY-135 - chimärer monoklonaler Antikörper gegen TRAIL-R2				
I/ II	Fortgeschrittene Tumore	Chemo	73/ 2 Responder	Sharma et al., 2014

1.4 APG350 - Eine neue rekombinante Form von TRAIL

Vor kurzem wurde eine neue rekombinante Form von TRAIL mit dem Namen APG350 von der Firma Apogenix GmbH (Heidelberg) entwickelt. Dieses TRAIL-Konstrukt ist ein vollständiges Fusionsprotein, welches als binäres Trimer kovalent an den modifizierten Fc-Teil eines humanen Antikörpers (IgG1-Fc) gekoppelt ist (Abbildung 1.5). Somit wird eine Rekrutierung von sechs TRAIL-Rezeptoren an der Zellmembran ermöglicht. Das Besondere an dieser rekombinanten TRAIL-Form ist, dass die drei TRAIL-Monomere jeweils über ein Verbindungsstück (Linker) miteinander verbunden sind. Daher wird eine hohe Rezeptor-Multimerisierung ohne zusätzliche Vernetzung ermöglicht.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das APG350 im Vergleich zu anderen rekombinanten Formen von TRAIL und einem Agonisten für TRAIL-R2 eine starke Apoptoseinduktion bei diversen Tumorzellen unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen bewirkt (Gieffers et al., 2013). So wurde eine effektive Induktion von Zelltod bei primären Tumorzellen und bei Tumorzelllinien von Kolon-, Leber-, Brust- oder Lungenkarzinomen erzielt. Weiterhin reduzierte die systemische APG350-Behandlung signifikant die Masse von Kolontumoren in einem subkutanen Mausmodell. In Toxizitätsstudien an Primaten erwies sich das APG350 als sichere Substanz ohne Lebertoxizität (Gieffers et al., 2013).

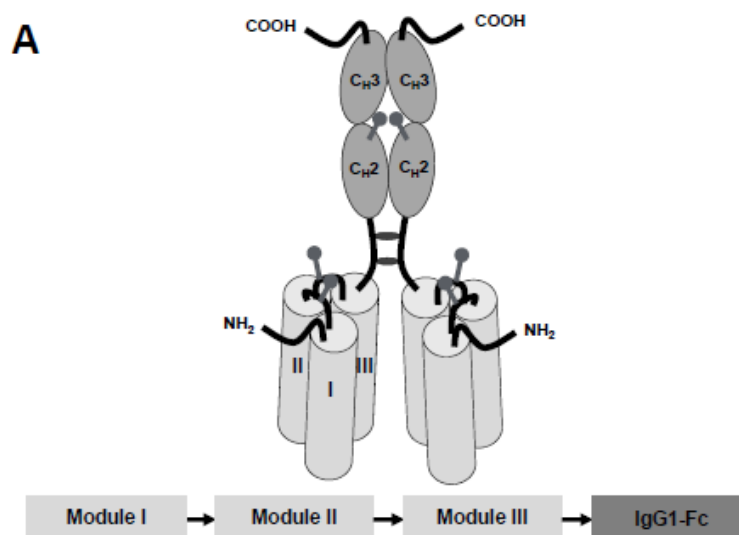


Abbildung 1.4: Molekulares Design von APG350, einer neuen rekombinanten Form von TRAIL.

Der Fc-Teil eines humanen Antikörpers (IgG1-Fc) ist über ein Verbindungsstück (Linker) an jeweils drei einzelkettige Polypeptide (Modul I – III) des Apoptose-induzierten Liganden TRAIL gekoppelt. Jedes Modul besitzt eine TRAIL-Rezeptor-Bindungsdomäne, die zusammen ein dimeres Molekül bilden und somit sechs TRAIL-Rezeptor-Bindungsstellen besitzt (Gieffers et al., 2013).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Hintergrund dieser Arbeit sind die Beobachtungen zu den Mechanismen der Signaltransduktion der TRAIL-Rezeptoren in Pankreastumoren. Die Rolle von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurde bei der Aktivierung der apoptotischen und der nicht-apoptischen pro-inflammatorischen Signaltransduktionswege beschrieben. Untersuchungen unter *in vivo* Bedingungen ergaben, dass die systemische Behandlung von resistenten Pankreastumoren mit rekombinanten TRAIL nur einen begrenzten therapeutischen Effekt auf das Wachstum von Primärtumoren hatte und gleichzeitig eine Stimulation der Lebermetastasierung bewirkte. APG350 ist eine hexavalente rekombinante Variante von TRAIL, die unabhängig von weiterem Clustering sehr stark Apoptose in Tumorzellen diverser Tumorentitäten induziert. Da ein therapeutischer Effekt auf das Pankreaskarzinom bisher nicht untersucht wurde, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von APG350 auf duktale Adenokarzinomzellen des Pankreas *in vitro* und *in vivo* zu testen.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

Wie effektiv induziert das hexamere APG350 die apoptotische Signalkaskade in Pankreaskrebszellen mit verschiedener TRAIL-Sensitivität im Vergleich zum trimeren TRAIL?

Verändert sich das Verhältnis der apoptotischen Signaltransduktion zur nicht-apoptischen, pro-inflammatorischen Signaltransduktion in resistenten Pankreaskarzinomzellen durch APG350 im Vergleich zu trimeren TRAIL?

Hat die Behandlung mit APG350 einen besseren therapeutischen Effekt auf das Wachstum von Primär- und Rezidivtumoren als die Behandlung mit trimeren TRAIL?

Bewirkt die APG350-Therapie eine Veränderung im Metastasierungsmuster in SCID bg Mäusen mit resistenten Pankreastumoren verglichen mit der TRAIL-Therapie?

2. Material und Methoden

Alle verwendeten Materialien und Geräte werden nachfolgend aufgelistet.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
10x Blue Juice: Gel Loading Buffer	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
2-Propanol, 70%	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken Deutschland
Aceton ROTIPURAN $\geq 99,8\%$ p.a. ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Antibody Diluent	Tytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Aquatex, wässriges Eindeckmedium für die Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Complete Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
DAB	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dithiothreit $\geq 99\%$ p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
E. coli FastMedia AMP AGAR	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA
EDTA Dihydrat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Einbettmedium	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Entwickler, G153 A/B	AGFA, Mortsels, Belgien

Material und Methoden

Eosin G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure, 100%	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, ≥99,8% p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Fixierer, G354	AGFA, Mortsel, Belgien
Formaldehyd- Fixierlösung 4 % für die Histologie	Merck Millipore, Deutschland
Fötale Kälberserum	Pan- Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, USA
Gen Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gen Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Glucose, 40 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glycerol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glycin ≥99% p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Dr. K Hollborn & Söhne GmbH & Co KG, Leipzig, Deutschland
HEPES	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hydrogen Peroxidase Block	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % Natriumchlorid	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol, ≥99,9% p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Natriumazid	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Natrium-deoxycholate	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Novex 4-20% Tris-Glycine Gel 1.0 mm x 10 Well 1.0 mm x 15 Well	Novex, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Pertex, Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
PhosStop Phosphataseinhibitor	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Ponceau-S-Lösung (0,1%ig in 5% HAc)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteinmarker: Spectra Multicolour Broad Range Protein ladder	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Puromycin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Salzsäure	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
SDS (Feststoff)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris HCl ≥99% p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trizma Base (Tris)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypanblau-Lösung, 0,4%	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tween-20	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ultra V Block	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
UltraPure Agarose	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

2.1.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Endotoxin-freies Plasmid DNA Kit: NucleoBond R PC 500 EF	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Human CXCL8/ IL-8 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, Kanada
Mouse on Mouse (M.O.M.) ImmPRESS HRP (Peroxidase) Polymer Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Cell Titer 96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, Mannheim, Deutschland
MycoTrace PCR Kit for Mycoplasma Detection	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
n-Histofine Simple Stain MAX PO System	Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Pierce Assay	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Retrovirale Vektoren

Name Konstrukt	Herkunft
CMV-VSV-G	Dr. Paul Robbins, Pittsburgh, Pennsylvania, USA (Howard et al., 2000)
pBabePuro	Erstellt von Lars Bönicke im Institut für Experimentelle Tumorforschung, Kiel
pIK6.1.gag/pol+(ATG)	Dr. T. Dull, Cell Genesis Corporation (Finer et al., 1997)
pPamII (Bcl-xL in pBabePuro)	Erstellt von Lars Bönicke im Institut für Experimentelle Tumorforschung, Kiel

2.1.4 verwendeter Bakterienstamm

E.coli Top10 Zellen für die Amplifikation von rekombinanten Plasmiden (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Primer	Sequenz
Babe 3'	CTTTATCCAGCCCTCAC
Babe 5'	ACCCTAACTGACACACATTCC

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-goat-IgG-HRP	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-mouse-IgG-HRP	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-rabbit-IgG-HRP	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti- β -actin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti-Bcl-x	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-Bid	R&D Systems, Minneapolis, Kanada
Anti-Caspase 3	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-Caspase 8	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-c-Flip	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Anti-IkBa	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-JNK	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland

Anti-p-38	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-P44/42	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-PARP	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-p-IkB α	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-p-JNK	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-p-p38	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-p-p44/42	Cell Signaling Technology, Frankfurt/ Main, Deutschland
Anti-TRAIL-R1 (Klone TR1.02)	Von H. Walczak (London, England) zur Verfügung gestellt
Anti-TRAIL-R2 (Klone TR2.21)	Von H. Walczak (London, England) zur Verfügung gestellt
Anti-TRAIL-R4 (Klone TR4.18)	Von H. Walczak (London, England) zur Verfügung gestellt
Anti-Pan-Cytokeratin (KL-1)	Beckmann Coulter, Marseille, Frankreich
Anti-Ki67	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-HMGA2	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-TRAIL-R1	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Anti-TRAIL-R2	ProSci, Poway, USA

2.1.7 Medien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Accutase (DPBS, 0,5 mM EDTA)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
DMEM (1x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
DPBS (1x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
GlutaMAX (100x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad,

	Kalifornien, USA
RPMI Medium-1640 (1x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Sodium Pyruvate 100mM (100x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin EDTA (10x)	GE Healthcare, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	Mengenangabe
Blottingpuffer (1x)	Tris-Base	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
HBSS-Puffer (1x)	NaCl	137 mM
	KCl	5 mM
	Na ₂ HPO ₄	0,7 mM
	Glucose	6,6 mM
	HEPES	21 mM
	pH=7,05 steril filtrieren	
Kristallviolett-Lösung	Kristallviolett	0,5 % w/v
	Methanol	20 %
Lämmli Puffer (4x)	TrisHCl (pH=6,8)	250 mM
	SDS	12,5 %
	Glycerol	40 %
	DTT	3 %
	Bromphenolblau	0,02 % w/v
LB-Medium	Trypton	10 % w/v
	Hefeextrakt	5 % w/v
	NaCl	5 % w/v
		Autoklavieren
LB-Agar Platten	LB-Medium	15 g/ l
	Agar-Agar	Autoklavieren
PBS (10x)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM

	KH ₂ PO ₄ pH=7,4	2 mM
RIPA-Puffer	TrisHCl (pH=7,5) NaCl NP40 Natriumdeoxycholat SDS	50 mM 150 mM 1 % v/v 0,5 % 0,1 %
RIPA-Puffer ++	1 Tablette Complete mini (Protease-Inhibitor) und 1 Tablette PhosphoStop (Phosphatase-Inhibitor) auf 10 ml RIPA-Puffer	
Sammelgel-Puffer (1x)	Tris-Base SDS pH=6,8	0,5 M 0,4 %
SDS-Laufpuffer (1x)	Tris-Base Glycin SDS pH= 7,4	25 mM 192 mM 0,1%
TAE-Puffer (1x)	Tris-HCl Natriumacetat EDTA pH=8,0	40 mM 5 mM 1 mM
TBS (1x)	Tris-HCl NaCl pH=7,4	50 mM 150 mM
TBS-T (1x)	Tris-Base NaCl Tween 20 pH=7,4	0,1 M 1 M 1 % (w/v)

2.1.9 Verwendete Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Colo205	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie, wachsen adhärent und in Suspension, aus maligner Aszites entnommen	freundlicherweise von Apogenix GmbH (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt
Colo357	Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie, wachsen adhärent,	Dr. Morgan, Denver, USA (Morgan et al., 1980)

	aus Lymphknotenmetastase regeneriert	
HEK293T	Humane primäre embryonale Nierenzelllinie mit konstitutiv exprimierendem Virus 40 (SV40) large T Antigen, wachsen adhärent	ACC 305; Leibnitz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Panc89	Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie, wachsen adhärent, aus einer Lymphknotenmetastase vom Pankreaskopf regeneriert	Dr. T. Okabe, Tokio (Okabe et al., 1983)
PancTul	Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie, wachsen adhärent, aus Primärtumor entstanden	Dr. M. von Bülow, Mainz, Deutschland (Moore et al., 2001)

2.1.10 Verwendete Substanzen

Substanz	Eigenschaften
Rekombinantes trimeres TRAIL In PBS pH 7,4 gelöst	Von PeproTech GmbH (Hamburg, Deutschland) erworben
Rekombinantes hexameres APG350 In PBS pH 7,4 gelöst	Von Apogenix GmbH (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt
Rekombinantes hexameres APG780 In PBS pH 7,4 gelöst	Von Apogenix GmbH (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt
Rekombinantes hexameres APG861 In PBS pH 7,4 gelöst	Von Apogenix GmbH (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt

2.1.11 Medikamente für Tierversuche

Medikament	Dosis	Hersteller
Alzane (Atipamezolhydrochlorid) 5 mg/ kg Injektionslösung	2,5 mg/ kg KG	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Dorbene vet (Medetomidinhydrochlorid) 1 mg/ml Injektionslösung	0,5 mg/ kg KG	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland

Material und Methoden

Fentanyl- hameln 50 µg/ ml Injektionslösung	0,05 mg/ kg KG	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, Deutschland
Flumazenil 0,1 mg/ ml Injektionslösung	0,5 mg/ kg KG	Inresa Arzneimittel GmbH, Breisgau, Deutschland
Midazolam- hameln 1 mg/ ml Injektionslösung	5 mg/ kg KG	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, Deutschland
Naloxon 0,4 mg/ ml Injektionslösung	1,2 mg/ kg KG	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Temgesic (Buprenorphinhydrochlorid) 0,324 mg/ ml	0,1 mg/ kg KG	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland

2.1.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Firma
8-Kanal-Pipette	300µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Abzug	Medizinbox MB85, Berner International, Elmshorn, Deutschland
Analysenwaage	BP310S, Satorius, Göttingen, Deutschland BP3100, Satorius, Göttingen, Deutschland
Aquadest Anlage	MILLI-Q Reagent water system, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Autoklav	CS-Labor 91782, Webeco, Selmsdorf, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell 150i, Thermo Scientific, Waltham, USA
Einkanal-Pipetten Eppendorf research	2,5µl/ 10µl/ 20µl/ 100µl/ 200µl/ 1000µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eismaschine	AF 200, Scotsman, Milan, Italien
Elektrophoresekammer	Novex MiniCell + XCell SureLock, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Flüssigkeitspumpe	KNF, Freiburg, Deutschland
Gefriermikrotom	Microm 560, Thermo Scientific, Rockford,

Material und Methoden

	USA
Hypercassette	RPN 11642, GE Healthcar, Freiburg, Deutschland
Inkubator (60°C)	Typ B6, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge	5415R, Rotor: F-45-24-11, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	MR3001, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroplattenreader	Magellan 6, Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop	CD2, Olympus, Hamburg, Deutschland Axio Scope.A1 mit AxioCam 503, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pascalgerät	S2800, Dako Cytomation California Inc, USA
pH-Meter	inolab pH-Level1, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetboy	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Powerpack	Standard Power Pack P25, Biometra, Deutschland
Roller	Roller mixer SRT6, Stuart, Staffordshire, UK RM5, Assistent, Altnau TG, Schweiz Roller mixer SRT9, Stuart, Staffordshire, UK
Röntgenfilm-Entwickler	Curix 60, AGFA, Mortsel, Belgien
Rotationsmikrotom	RM 2245, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Rotator	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schüttelinkubator	TH30, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Sonifizierer	MSE Scientific Instruments, London, England
Spektralphotometer	NanoDrop 2000, Fisher Scientific,

Material und Methoden

	Schwerte, Deutschland
Stepper	Multipette plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	LaminAir HB 24724, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland Hera Safe HS12, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	mini Spin plus, Rotor: F-45-12-11, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallgerät	MSE Scientific Instruments, London, England
Ultrazentrifuge	TL-100 Ultra, Rotor: TLA100, Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortex Mixer	Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
WB-Kammer	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellzähler	Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Zentrifuge	Rotina 48R, Rotor: 4394, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Firma
Röhrchen 15 ml/ 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläschen, 24 x 60 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Gewebekulturflasche (25/75/175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekulturplatten, 6-/96-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekulturschale (150x20mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Material und Methoden

Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Kanüle, Microlance 3 (26G)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Microloader Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microtiterplatte 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microvette CB300Z	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mullkompressen 5 x 5 cm	Karl Beese GmbH & Co KG, Barsbüttel, Deutschland
Nitril-Handschuhe, Nitratex micro-touch	Ansell, München, Deutschland
Objektträger – superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M	Brand, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipette, 230 mm	Hecht-Assistant, Sondheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 20 µl/200 µl/ 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Primariaschalen	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Skalpell, No. 11	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Skalpell, No. 22	
Spritze, 1 ml/ 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Transwell-Einsätze mit 24-Well-Platte	Corning, Tewksbury, USA
UZ-Röhrchen	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Wattestäbchen 5 mm	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter, Deutschland
WB-Filterpapier, Whatman 3 mm	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellzähl-Slides SD100	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Insulinspritzen U-40, 0,5 ml, 30G	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Acrodisc 25 mm Syringe Filter, 0,45 µm	Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
PVDF-Membran, Immobilon-P 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CryoPure Gefäß 1,8 ml Weiss	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kombitips, 2,5 ml/ 5 ml/ 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
serologische Pipetten (5 /10 /25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese in fetalem Kälberserum (*Fetal Calf Serum* (FCS) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

Die Pankreasadenokarzinomzelllinien wurden in dem Zellkulturmedium *Roswell Memorial Institute-1640* (RPMI-1640) und die Kolonkarzinomzelllinie in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % FCS sowie den Zusätzen 2 mM Glutamax und 1 mM Natriumpyruvat in T25-, T75- oder T175-Zellkulturflaschen standardisiert kultiviert. Dabei sind die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % bebrütet worden.

Die stabil transfizierten Zelllinien Colo357 Bcl-xL und Colo357-Vektor wurden mit 2 µg/ml Puromycin kultiviert.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen kurz bei 37 °C angetaut und mit warmem Zellkulturmedium versetzt. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren bei 400 x g für 4 min, um das Einfriermedium zu eliminieren. Nach Entfernung des Überstands die Zellen in frischem RPMI-1640 Medium (mit 10 % FCS, Glutamax und Natriumpyruvat) gehalten.

Morphologie und Vitalität der Zellen wurden regelmäßig mittels Mikroskop (CK2, Olympus, Hamburg, Deutschland) beobachtet und protokolliert. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 70 - 90 % erreicht, sind diese passagiert worden, um ein einschichtiges adhärentes Wachstum zu gewährleisten.

Zum Passagieren der adhärent wachsenden Pankreastumorzellen wurde der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen einmal mit *Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und diese anschließend mit der Serinprotease Trypsin inkubiert. Durch Zugabe von frischem Medium gleichen Volumens konnte die Reaktion abgestoppt werden. Die abgelösten Zellen wurden vorsichtig aus der Zellkulturflasche in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer 4-minütigen Zentrifugation bei 400 x g wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Mediumüberstand entfernt und das Zellpellet in frisches Medium aufgenommen.

Beim Passagieren der Zelllinie Colo205, welche adhärente- und Suspensionszellen enthält, wurde der Zellkulturüberstand mitverwendet. Die flotierenden Zellen sind im Falcon-Röhrchen gesammelt, bei 400 x g für 4 min zentrifugiert und einmal mit DPBS gewaschen

worden. Die adhärennten Zellen wurden ebenfalls einmal mit DPBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Alle Zellen wurden dann in einem Falcon-Röhrchen vereint, für 4 min bei 400 x g zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

Die vereinzelteten Zellen sind in einem Teilungsverhältnis von 1:3 bis 1:5 mit frischem RPMI-Medium (10 % FCS und Zusätze) in T25-, T75, bzw. T175-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert worden.

In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Überprüfung der Zellen auf Mycoplasmenkontamination. Dazu wurde eine Mycoplasmen-PCR nach Herstellerprotokoll (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) durchgeführt.

2.2.1.2 Zählen und Aussäen von Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl kam ein automatischer Zellzähler (Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA) zum Einsatz. 20 µl Zellsuspension wurden in Einmalzählkammern pipettiert. Die Anzahl der Zellen pro ml konnte per Betreibersoftware ermittelt werden. Da die Größe und Form der Zellen jeder Zelllinie variiert, wurde zuvor das Gerät manuell kalibriert.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden 1×10^4 Zellen in Löcher einer 96-Loch-Platte mit einem Volumen von 100 µl ausgesät. Im zweiten Abschnitt erfolgte die Aussaat von $2,0 \times 10^5$ Zellen für die 3-stündige Stimulation bzw. $2,8 \times 10^5$ Zellen für die 24-stündige Stimulation in Löcher einer 6-Loch-Platte mit 2 ml frischem Medium. Die Anwachszeit betrug jeweils 24 h.

2.2.1.3 Dosis-Wirkungs-Kurven

Um die pharmakologische Wirkung von APG350 auf humane Tumorzellen zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und der EC₅₀-Wert (*effective concentration/* mittlere effektive Konzentration) bestimmt.

Die Krebszellen wurden dazu in Löcher von 96-Loch-Platten ausgesät. Die Stimulation dieser Zellen erfolgte mit der Testreagenz APG350 sowie den Vergleichssubstanzen TRAIL, APG780 und APG861. Als Kontrolle diente *Phosphat-Buffered Saline* (PBS), welches in gleichem Volumen eingesetzt wurde.

Bei den adhärennt wachsenden Zellen ist dann das alte Medium entfernt und mit 100 µl frischem Medium (mit APG350, TRAIL, APG780 bzw. APG861) angesetzt worden.

Demgegenüber wurde kein Mediumwechsel bei der APG350-Testung auf die Zelllinie Colo205 vorgenommen. Hier wurden die Substanzen direkt in 100 µl Medium aufgenommen und in Löcher der 96-Loch-Platte mit vorhandenem Medium pipettiert. Nach der 24-stündigen

Stimulation wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.1.4) und MTS-Assay (siehe Abschnitte 2.2.1.5) ermittelt.

Für die Analyse der apoptotischen und nicht-apoptotischen, pro-inflammatorischen Signalwege wurden die Zellen in Löcher einer 6-Loch-Platte ausgesät, für 24 h angezüchtet und mit APG350, TRAIL, APG780, APG861 oder PBS stimuliert. Die Inkubation der Substanzen betrug 3 bzw. 24 h. Die Herstellung von Proteinextrakten wird in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben.

2.2.1.4 Kristallviolett-Färbung

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde die Kristallviolett-Färbung verwendet. Bei diesem Zytotoxizitätsassay interkaliert der blaue Farbstoff Kristallviolett mit der DNA und färbt die Zellen somit blau.

Nach 24-stündiger Substanzstimulation wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, für 30 min bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert und der gewonnene Überstand für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde die Platte auf Papiertücher ausgeklopft, um alle löslichen Zellen zu entfernen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit 50 µl Kristallviolett-Lösung (0,5 % in Methanol). Im nächsten Schritt ist die Lösung entfernt und je Loch 5 Mal mit 200 µl *Aqua dest.* gewaschen worden. Zum vollständigen Entfernen der Flüssigkeit trocknete die Platte über Nacht bei Raumtemperatur (RT) oder 2 - 3 h bei 37 °C. Das Kristallviolett wurde mit 200 µl Methanol für 20 min aus den Zellen gelöst. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 590 nm bis 700 nm mit dem Mikroplattenreader (Magellan 6, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Viabilität der stimulierten Zellen wurde mit der Viabilität der Kontroll-Gruppe (unbehandelte Zellen) verglichen.

2.2.1.5 Zytotoxizitätstest (MTS-Tetrazolium-Assay)

Der Zytotoxizitätstest (MTS-Assay) ist eine kolorimetrische Methode und wurde als ein weiterer Test zur Bestimmung der Zellviabilität verwendet. Dieses System beruht auf der Reduktion von der MTS-Tetrazoliumverbindung zu Formazan. Diese Reaktion wird von lebenden Zellen umgewandelt.

Die Tumorzellen wurden für 24 h mit den Substanzen APG350, TRAIL, APG780 oder APG861 stimuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl *One Solution Reagent*. Die Inkubationszeit dieser Substanz betrug 1 - 4 h, abgedunkelt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem Mikroplattenreader (Magellan 6, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen, wobei die ermittelte Absorption direkt

proportional zur Anzahl der lebenden Zellen war. Die Viabilität der stimulierten Zellen wurde mit der Viabilität der Kontroll-Gruppe (unbehandelte Zellen) verglichen.

2.2.1.6 Interleukin-8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (IL-8 ELISA)

Die IL-8-Zytokinkonzentration wurde mittels *Interleukin-8* (IL-8)-ELISA nach Herstellerprotokoll (Human CXCL8/ IL-8 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, Kanada) bestimmt.

Die Krebszellen sind mit den Reagenzien APG350, TRAIL, APG780 oder APG861 stimuliert worden. Nachfolgend wurde der Mediumüberstand gesammelt und für 30 min bei 4°C und 16.100 x g zentrifugiert. Bis zur Verwendung lagerten die Proben bei -80 °C. Die absolute IL-8-Konzentration wurde als Induktion zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) berechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung und Vervielfältigung von Plasmid-DNA

Für die Vervielfältigung der Plasmide pPamII und pBabePuro sowie pIK6.1.gag/pol+(ATG) und CMV-VSV-G wurden *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet und die Plasmid-DNA durch Hitzeschock transformiert. Durch ein spezielles Verfahren wird der *E.coli*-Stamm Top 10 in einen kompetenten Zustand versetzt, der ihm die effektive Aufnahme von DNA ermöglicht.

Für die Transformation wurde pro Ansatz ein Aliquot mit chemisch kompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und 100 ng/µl Plasmid-DNA hinzugefügt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mittels Eis. Dem anschließenden Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C folgte erneut eine 5-minütige Inkubation der Zellen auf Eis. Diese Zellen wurden danach mit 250 µl *Lysogeny Broth* (LB)-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C per Schüttelinkubator (TH30, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland) bebrütet.

Im nächsten Schritt wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert. Am folgenden Tag wurde pro Plasmid eine einzelne Bakterienkolonie von den Platten entnommen und einer LB-Medium-Vorkultur mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C schüttelnd für 5 - 7 h. Danach wurde zur Anzucht der Bakterien eine LB-Medium-Hauptkultur angeimpft sowie diese über Nacht bei 37 °C erneut inkubiert.

Anschließend wurden die gewachsenen Bakterienkulturen bei 4 °C für 30 min und 6.000 x g zentrifugiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA ist ein endotoxinfreies Plasmid-DNA-Kit (NucleoBond R PC 500 EF, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet und die Isolierung nach Herstellerangaben durchgeführt worden. Die Konzentration der gewonnenen DNA konnte mittels Spektralphotometer (NanoDrop 2000,

Fisher Schwerte, Deutschland) bestimmt werden. 1 µl unverdünnte Probe wurde direkt auf die Messoberfläche des Gerätes pipettiert und deren Absorption gemessen. Um sicherzustellen, dass das Plasmid pPamII die Bcl-xL-Sequenz enthält, wurde eine kleine Menge der Plasmid-DNA extern sequenziert (Fa. SeqLab Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland).

2.2.2.2 Herstellung stabiler Colo357 Bcl-xL-Zellen

Zur Erstellung stabiler Bcl-xL überexprimierender Colo357-Zellen kam die Calcium-Phosphat-Methode zum Einsatz. Colo357-Zellen wurden mit dem Überstand der virusproduzierenden Packzelllinie HEK293T infiziert. Dazu ist der retrovirale Vektor mit Transgen (pPamII = Bcl-xL in pBabePuro) und als Kontrolle der Vektor ohne Transgen (pBabePuro) verwendet worden.

Als retroviraler Packvektor diente pIK6.1.gag/pol+(ATG). Dabei codieren *gag* Strukturproteine des Nukleokapsids und *pol* virale Enzyme wie z.B. die Integrase und die reverse Transkriptase. Weiterhin wurde der Packvektor CMV-VSV-G verwendet. Diese beiden Vektoren sind für die Herstellung von Virusüberständen in humanen embryonalen Nierenzellen HEK293T von großer Bedeutung.

Für die Transfektion wurden in 10 cm große Primariaschalen 2×10^6 HEK293T-Zellen in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM Glutamax und 1 nM Natriumpyruvat ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen ist das verbrauchte Medium gegen neues DMEM ausgetauscht worden. Im Anschluss daran wurde der Transfektionsmix hergestellt und tropfenweise in der Zellkulturschale verteilt. Nach 18 h erfolgte erneut ein Austausch des Mediums.

Der Transfektionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 418 µl Aqua dest.
- 10 µl DNA pPamII oder pBabePuro (2 µg/µl)
- 5 µl pIK6.1.gag/pol+(ATG) (2 µg/µl)
- 5 µl CMV-VSV-G (2 µg/µl)
- 62 µl 2 M Calciumchlorid (CaCl₂)
- 500 µl 2 x Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

Parallel dazu wurden die Zielzellen Colo357 in Löcher einer 6-Loch-Platte mit der Anzahl von 2×10^5 Zellen ausgesät. Um die Infektion der Zellen mit den Viruspartikeln zu erleichtern, wurde Polybren (8 μ l) zu den Zellen gegeben.

Nach 24 h, d.h. 42 h nach Transfektion, erfolgte die Transduktion. Dazu wurde der Virusüberstand der HEK293T-Zellen in einer Spritze gesammelt, durch einen 0,45 μ m Acrodisc-Filter gegeben und auf die Zielzellen Colo357 überführt. Nach 24 h ist der Mediumüberstand von den Tumorzellen entfernt und das Selektionsmedium RPMI-1640 mit 2 μ g/ml Puromycin hinzugefügt worden. Nicht-transfizierte Colo357-Zellen mit und ohne Puromycin dienten als Kontrolle für den Erfolg der Transduktion.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Ganzzell-Lysaten

Zur Isolierung von Proteinen wurden die Tumorzellen in Löcher einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach einer 24-stündigen Anwachszeit erfolgte die 3- bzw. 24-stündige Behandlung dieser mit APG350, APG780, APG861 oder TRAIL sowie PBS als Kontrolle. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte auf Eis mittels *Radio-Immunoprecipitation-Assay*-(RIPA-) Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, um eine enzymatische Degradation und um Dephosphorylierungen zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei -20 °C eingefroren. Mit einem Ultraschallgerät (MSE Scientific Instruments, London, England) sind die zerplatzten Zellen aufgeschlossen sowie bei 4 °C für 15 min und 16.100 x g zentrifugiert worden, um nicht gelöste Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Für die Extraktion von Proteinen aus experimentellem Tumorgewebe wurde dieses nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und danach bei -80 °C gelagert. Das Schneiden der Gewebeproben erfolgte mit dem Gefriermikrotom (Microm 560, Thermo Scientific, Rockford, USA) bei einer Kammertemperatur von -20 °C. Die Gewebestücke wurden mit Einbettmedium ummantelt und in die Haltevorrichtung des Mikrotoms eingespannt. Es wurden 5 x 20 μ m dicke Schnitte bei einer Gefriertemperatur des Objektisches von -13 °C hergestellt. Die Schnitte wurden umgehend in eiskaltem Lysispuffer (RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) aufgenommen und bei -20 °C tiefgefroren. Im nächsten Schritt ist das Gewebe durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit

einer 26-Gauge-Kanüle homogenisiert worden. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation der Proben bei 16.100 x g und 4 °C wurde der Überstand bei -20 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (Pierce-Assay)

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Bicinchoninsäure- (BCA-) Assay nach Pierce entsprechend der Herstellerangaben (Pierce-Assay, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Die aufgetauten Extrakte wurden 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt. Für jede Probe ist eine Doppelbestimmung zweier Verdünnungen hergestellt worden. Als Standardreagenz diente Albumin in definierten Konzentrationen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Fertigsbstanz des Herstellers in einem Verhältnis von 1:50 für 20 min bei 60 °C.

Es ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm bis 690 nm gemessen und danach die Proteinmenge der Lysate bestimmt worden.

2.2.3.4 Western Blot

Bei der *Western Blot* Methode wird eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe vorgenommen und deren Größe mit Hilfe eines mitlaufenden Probenmarkers verglichen. Zum Angleichen des identischen Volumens jeder einzelnen Proteinprobe wurden diese mit RIPA-Puffer versetzt. Diese Proben wurden mit *sodium dodecyl sulfate*- (SDS-) haltigem 4x Lämmli-Puffer gemischt, für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und in Taschen eines 4 - 20 % Tris-Glycin-Gels pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Kammer bei einer konstanten Spannung von 125 V für 2 - 3 h.

Anschließend wurden die Proteine auf eine *polyvinylidene difluoride*-(PVDF-) Membran mittels Nass-Blot-Verfahren transferiert. In eine Blotkassette wurde ein Whatman-Papier auf ein Schwämmchen gelegt und darauf das Tris-Glycin-Gel vorsichtig platziert. Zur Aktivierung der PVDF-Membran ist diese für 5 sec in 100 % Methanol und anschließend in *Aqua dest.* inkubiert worden, bevor sie auf das Gel transferiert wurde. Den Abschluss in der Kassette bildeten ein Whatman-Papier und ein weiteres Schwämmchen. Diese Blotkassette wurde in eine Kammer gesetzt und mit Puffer gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte gekühlt für 1 h 30 min bei 400 mA und konstanter Spannung.

Im Anschluss daran wurde die Membran für 20 min getrocknet und für 1 h mit 5 %-iger Magermilch in *Tris-Buffered Saline-Tween* (TBS-T) oder mit 5 %-igem *Bovine Serum Albumin* (BSA) in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die

Inkubation des Primärantikörpers (in 0,5 % oder 5 % Magermilch/ TBS-T bzw. 5 % BSA/ TBS-T) erfolgte schüttelnd bei 4 °C über Nacht.

Im nächsten Schritt wurde die Membran 3 x 10 min in TBS-T gewaschen und in *horseradish peroxidase*-(HRP-) konjugiertem Sekundärantikörper (in 0,5 % oder 5 % Magermilch/ TBS-T bzw. 5 % BSA/ TBS-T) für 1 h bei RT inkubiert. Diese Membran ist dann erneut 3 x 10 min in TBS-T gewaschen worden.

Es folgte die Inkubation der PVDF-Membran mit *Enhanced Chemiluminescence*- (ECL-) Detektionsreagenzien, um die Chemilumineszenz in der Dunkelkammer auf einen lichtempfindlichen Röntgenfilm zu transferieren und um ein Signal in einer Entwicklermaschine zu erhalten.

2.2.4 Immunhistochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten an kryokonserviertem Material

Das entnommene Gewebe wurde nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Dieses ist anschließend mit Einbettmedium umlagert und im Gefriermikrotom (Kammertemperatur -20 °C) auf dem Objektisch (Temperatur -13 °C) fixiert worden. Es wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Dann erfolgte über Nacht deren Trocknung und Einfrierung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung an kryokonserviertem Material

Die *Hämatoxylin-Eosin*-Färbung (HE-Färbung) ist eine Routinemethode und dient als Übersichtsfärbung. Die 5 µm dicken Gewebeschnitte wurden für 7 min in -20 °C gekühltem Aceton fixiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Hämalaun für 3 min. Dieses Material wurde in *Aqua dest.* für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend erneut in *Aqua dest.* gespült. Es folgte eine 30-sekündige Inkubation mit Eosin (gelöst in 1 %-igem Ethanol). Dann wurden die Gewebeschnitte in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 2 min in 70 %, 80 % und 100 % Ethanol entwässert. Die Objektträger wurde mit einem Tropfen Eindeckmedium (Mountex) versetzt und die Schnitte mit einem Deckgläschen versehen.

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung an kryokonserviertem Material

Die auf Objektträger gezogenen Schnitte wurden für 10 min in Aceton fixiert. Es erfolgte ein Waschschrift in *Tris-Buffered Saline* (TBS) und eine 5-minütige Inkubation dieser mit *Peroxidase Blocking Solution*. Anschließend wurden die Schnitte zunächst 3 x 5 min in TBS gewaschen und mit Primärantikörper (in Verdünnungspuffer) für 30 min bei RT benetzt. Dann ist der Antikörper durch 3 x 5 min Spülen in TBS entfernt worden.

Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 30 min bei RT. Danach wurden die Schnitte erneut 3 x 5 min in TBS gewaschen und für 5 min mit *3,3'-Diaminobenzidine* (DAB) benetzt.

Nun sind die Gewebeschnitte in *Aqua dest.* gespült, für 7 min mit Hämatoxylin inkubiert und für 1 min unter fließendem Leitungswasser gebläut worden. Dann konnte das gefärbte Gewebe mit Eindeckmedium (Aquatex) eingedeckelt werden.

2.2.4.4 Herstellung von Gewebeschnitten an formalinfixiertem Paraffinmaterial

Zur Fixierung der Gewebeproben wurden sie umgehend in 4 %-ige Formaldehydlösung überführt. Nach 48 h sind diese einzeln in kleine Gitter gelegt und in einem Gewebereinbettautomaten (Leica) entwässert worden. Dann erfolgte das Gießen der Proben in Paraffin.

Es wurden 2 µm dicke Schnitte mit dem Rotationsmikrotom hergestellt. Diese wurden auf Objektträger gezogen, über Nacht im Brutschrank bei 54 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.4.5 Immunhistochemische Färbung an formalinfixiertem Paraffinmaterial

Für die Analyse der Proteinexpression im experimentellen Tumorgewebe wurden immunhistochemische Färbungen an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe durchgeführt.

Es sind 2 µm dicke Schnitte in absteigender Alkoholreihe 2 x 10 min in Xylol, 2 x 2 min in 96 % Ethanol, 1 x 2 min in 70 % Ethanol, 1 x 2 min in 50 % Ethanol und 2 x 2 min in *Aqua dest.* rehydriert worden. Anschließend erfolgte die Demaskierung im Pascalgerät (S2800, Dako Cytomation California Inc, USA) bei 120 °C, um das bei der Fixierung maskierte Epitop für den Antikörper wieder zugänglich zu machen. Die Gewebeproben wurden unter Leitungswasser abgekühlt und für 5 min in TBS gespült.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit 2 - 3 Tropfen *Hydrogen Peroxidase Block* benetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden diese 3 x in TBS gespült und mit 2 - 3 Tropfen *Ultra V Block* für 5 min bei RT benetzt, um unspezifische

Bindungen der Antikörper zu verhindern. Folgend wurden sie 3 x 2 min in TBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit Primärantikörper (verdünnt in *Reagent Diluent*) benetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach 3 x 5-minütigem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit Sekundärantikörper für 30 min bei RT benetzt.

Anschließend sind die Schnitte 3 x 5 min in TBS gespült sowie mit dem Chromogen DAB für 6 min inkubiert worden. Die Gewebeproben wurden im nächsten Schritt in *Aqua dest.* gespült und zur Kernfärbung mit Hämalaun für 1 min benetzt. Es folgte das Bläuen der Schnitte für 10 min unter fließend lauwarmem Leitungswasser. Dieses gefärbte Material wurde in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol gelagert und mit Eindeckmedium (Pertex) eingebettet.

Zur Kontrolle der Färbungen wurden die verschiedenen Reaktionsschritte auf ihre Spezifität hin untersucht. Als Negativkontrolle dienten Gewebeproben, die statt des Primärantikörpers nur mit Verdünnungspuffer (*Reagent Diluent*) inkubiert wurden. Weiterhin sind gegen Mausproteine gerichtete Isotyp-Kontrollen (IgG-Kontrollen) verwendet worden. Als Positivkontrolle wurden Schnitte eines humanen duktales Pankreaskarzinoms zu den Färbungen aufgenommen.

2.2.5 Tierversuche

Zum Verständnis der therapeutischen Wirkung von APG350 auf das Wachstum der Pankreastumore und die Ausbildung von Fernmetastasen wurde das orthotope Xenotransplantationsmodell verwendet.

Für die Entstehung eines soliden Tumors sind humane Pankreaskrebszellen in die Bauspeicheldrüse von immundefizienten *Severe combined immunodeficiency*-(SCID)-*beige*-(bg)-Mäusen injiziert worden. Diese Tiere haben zwei autosomal-rezessive Mutationen, SCID (*Prkdc^{scid}*, Gen auf dem Chromosom 16) und *beige* (*Lyst^{bg}*, Gen auf dem Chromosom 13). Homozygote Tiere weisen eine B-, T- und natürliche Killer-(NK)-Zelldefizienz. Die Differenzierung von Lymphozyten aus Stammzellen wird verhindert. Diese Eigenschaften ermöglichen die Aufnahme von körperfremden Zellen.

Im Phänotyp haben die Mäuse unterentwickelte lymphatische Organe, keine funktionellen B- und T-Zellen, eine Lymphopenie und eine Hypoimmunoglobulinämie.

2.2.5.1 Versuchstierhaltung

4 - 6 Wochen alte, weibliche SCID-bg-Mäuse (Nomenklatur: CB17.Cg-*Prkdc^{scid}Lyst^{bg}*-J/Crl) wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Deren Akklimatisierungszeit betrug 14 Tage. Die Tiere wurden unter *spezifiziert pathogenfreier* (SPF-) Barrieretierhaltung in Filtertopkäfigen gruppenweise gehalten. Im Anschluss an die

chirurgischen Operationen wechselten diese in die *individually ventilated cages* (IVC-) Käfighaltung. Die Mäuse bekamen Futter und Wasser *ad libitum*. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den lokalen Behörden (Aktenzeichen Tierversuchsvorhaben: V 311-72241.121-7 (52-4/12)) und den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2.5.2 Orthotopes Xenotransplantationsmodell

Humane Pankreaskarzinomzellen wurden in der Zellkultur unter Standardbedingungen gezüchtet. Die adhärenen Zellen sind einmal mit DPBS gewaschen und zum Ablösen mit Accutase inkubiert worden. Anschließend wurden diese Zellen in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und bei 400 x g für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und die Zellen vorsichtig vereinzelt. 1×10^6 Tumorzellen wurden bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und dann der Überstand entfernt. Das gewonnene Zellpellet wurde vorsichtig in 25 µl Matrigel aufgenommen und in eine Spritze gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese auf Eis gelagert.

Für die Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse mittels intraperitoneal (i.p.) applizierter, gewichtsangepasster Narkose (Medetomidin 0,5 mg/kg KG; Midazolam 5 mg/kg KG; Fentanyl 0,05 mg/kg KG) in einem Volumen von 100 µl anästhesiert. Die Augen sind vor Austrocknung mit Augencreme bedeckt worden. Das Abdomen wurde mit einem Einwegrasierer von Haaren befreit. Während der gesamten Operationsdauer sind die Tiere mittels Wärmematten und einer Infrarotlampe warm gehalten worden, um eine Unterkühlung zu vermeiden. Über eine mediane Laparotomie und der vorsichtigen Exposition des Mauspankreas erfolgte die Applikation der zuvor vorbereiteten Spritzen mit humanen Tumorzellen. Anschließend wurden Pankreas und Organe repositioniert und der Bauchraum mehrschichtig mit Nahtmaterial Vicryl 6/0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Nach den chirurgischen Eingriffen wurde den Tieren 100 µl 5 %-ige Glucose subkutan appliziert. Dann ist der Antagonist (Flumazenil 0,5 mg/kg KG; Naloxon 1,2 mg/kg KG; Atipamezol 2,5 mg/kg KG) in einem Volumen von 25 µl zur Ausleitung der Narkose verabreicht worden. Als Analgesie bekamen die Mäuse 75 µl Buprenorphin (Temgesic 0,1 mg/kg KG) subkutan und wurden während der Aufwachphase mit einer Infrarotlampe gewärmt.

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde an den darauffolgenden Tagen zwei Mal täglich beobachtet. Danach erfolgte die Überwachung der Tiere zwei Mal pro Woche, wobei Bewegungsmuster und Fressverhalten sowie das Körpergewicht dokumentiert wurden.

2.2.5.3 Primäres Tumormodell mit konservativer Therapie

Zur Untersuchung der pharmakologischen Wirkung von APG350 auf primäre Pankreastumore wurden humane Tumorzellen in den Pankreas von SCID-bg-Mäusen inokuliert.

Nach Ausbildung eines soliden Tumors startete nach vier Tagen die konservative Therapie für fünf folgende Tage (Abbildung 2.1). Die Mäuse wurden bei einer Gruppengröße von 8 Tieren 1 x täglich entweder mit APG350 (3 mg/ kg KG), TRAIL (3 mg/ kg KG) oder PBS intraperitoneal behandelt.

Um die Blutkonzentration von APG350 und TRAIL zu bestimmen, wurden den Mäusen am ersten und am letzten Behandlungstag je 30 min nach Applikation Blut mittels Schwanzvenenpunktion entnommen. Dieses Vollblut ist anschließend bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert und das so gewonnene Serum bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren worden.

Am Ende der Versuche wurden die Tiere narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Tumore wurden entnommen, vermessen und gewogen. Auch die Zahl der Metastasen in Leber und Milz wurde dokumentiert.

Für die histologische Aufarbeitung wurden Tumorgewebe und andere Organe in jeweils Hälften geteilt und sofort fixiert, um eine Zersetzung des Gewebes zu verhindern. Dazu wurden das eine Gewebestück in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und das andere in 4 %-iger Formaldehydlösung gelagert.

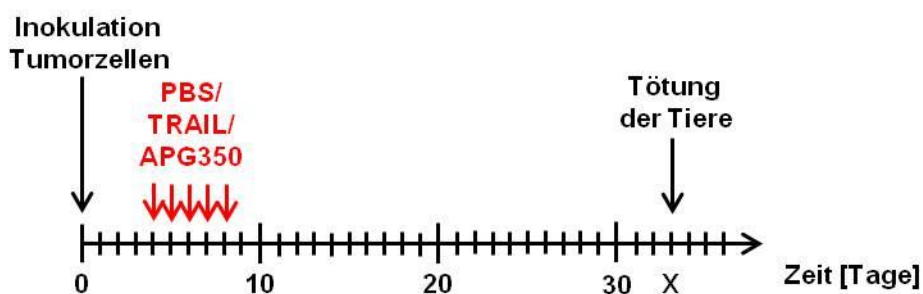


Abbildung 2.1: Konservatives Therapieschema.

2.2.5.4 Resektionsmodell mit adjuvanter Therapie

In weiterer Annäherung an die klinisch-chirurgische Situation wurde das bestehende Xenotransplantationsmodell um eine Resektion des Primärtumors erweitert. Dieses erlaubt die Untersuchungen von Rezidivtumoren und deren Metastasierung.

Die Tumorzellen wurden, wie unter Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben, in den Pankreas von SCID-bg-Mäusen inokuliert.

Nach 14 Tagen erfolgte die Resektion des Primärtumors mittels Relaparotomie und eine subtotale Pankreatektomie (**Abbildung 2.2**). Dann schloss sich nach vier Tagen die adjuvante Therapie entsprechend des Behandlungsschemas, wie in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben, an. Am ersten und am letzten Behandlungstag wurde von jedem Tier Blut entnommen, um den Serumspiegel von APG350 und TRAIL zu bestimmen.

Die Versuche wurden, wie unter Abschnitt 2.2.5.3 genannt, beendet und die Gewebeproben für histologische Untersuchungen vorbereitet.

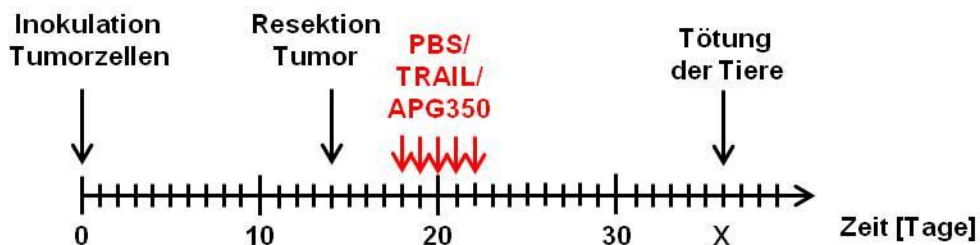


Abbildung 2.2: Adjuvantes Therapieschema.

Um den Krankheitsverlauf nach palliativer und adjuvanter Therapie mit APG350, TRAIL oder PBS zu untersuchen, wurde die nicht-invasive Kleintierbildgebung angewandt. Diese ermöglicht zum einen eine morphologische Begutachtung der Tumore während des laufenden Versuches und erlaubt zum anderen gleichzeitig das Ermitteln von Fernmetastasen in Organen wie Leber und Milz.

Es wurde das Kleintier-Sonographiegerät Vevo2100 (VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) verwendet, welches mit einer Auflösung von 30 μm detaillierte, morphologische Informationen liefert. Die Tiere sind mit gewichtsangepasster Narkose anästhesiert und auf einer Wärmeplatte fixiert worden. Das von Haaren entfernte Abdomen wurde mit Ultraschallgel (Aquasonic 100 ultrasound transmission gel, PARKER Laboratories, Fairfield, New Jersey, USA) bedeckt. Zum Aufsuchen des Tumors ist der Schallkopf in sagittaler und transversaler Orientierung aufgesetzt worden. Die Bildaufnahme erfolgte in 3D-Datensätzen im B-Mode. Nach der Sonographie wurden die Narkose antagonisiert und die Mäuse während der Aufwachphase gewärmt. Für die Volumetrie der Tumore wurde die Vevo2100 Software (Version 1.4.0) verwendet. Repräsentative Bilder wurden exportiert und als Bilddateiformat gespeichert.

Am Ende jeden Versuches wurde der ClinScan 7 Tesla Kernspintomograph (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) verwendet. Dieses Ganzkörper-MRT erlaubt die Lokalisation sowohl von Primär- und Rezidivtumoren als auch von Metastasen in Organen wie Leber und Milz zu bestimmen. Die Mäuse wurden mittels Narkose betäubt und auf eine Haltevorrichtung fixiert. Während der Messungen ist eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran gegeben worden. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software syngo® MR B15.

2.2.5.6 Bestimmung des APG350- und TRAIL-Spiegels im Serum von SCID bg Mäusen

Am 1. und 5. Behandlungstag wurden 30 min nach Substanzgabe allen Tieren Blut mittels Schwanzvenenpunktion entnommen, bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert und das Serum in ein neues Cup überführt. Bei den APG350-behandelten Tieren wurde ein ELISA für die Bestimmung der APG350-Konzentration und bei den TRAIL-behandelten Mäusen wurde ein anderer ELISA für die TRAIL-Konzentration im Mausserum angewandt. Die Kontrollen (Serum von PBS-behandelten Tieren) wurden zur Überprüfung der Spezifität mit beiden ELISA-Methoden gemessen.

2.2.5.7 Statistische Auswertung und Prüfung auf Signifikanz

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der GraphPad Software GraphPad Prism 4 (Windows 4.03).

Es wurde eine Dependenzanalyse durchgeführt, um Unterschiede in den Gruppen festzustellen. Die Werte der *in vitro*-Versuche wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels t-Test für unverbundene Stichproben. Die Werte in den *in vivo*-Experimenten wurden als Median \pm Standardabweichung ausgedrückt. Um zu überprüfen, ob sich zwei verschiedene Stichproben unterscheiden wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um Unterschiede in der Häufigkeit von Stichproben auszudrücken, wurde der Binominal-Test angewandt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch „signifikant“ (*) und ein Wert $\leq 0,01$ als statistisch „hoch signifikant“ (**) angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 *in vitro*-Analysen

3.1.1 APG350 induziert Apoptose in PDAC-Zellen

Untersuchungen von Gieffers und seinen Kollegen zur Wirkung von APG350 *in vitro* ergaben, dass dieser hexavalente TRAIL-Rezeptor-Agonist in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Colo205 effektiv die Apoptose auslöst (Gieffers et al., 2013). Zu Beginn der Arbeit sollten diese Ergebnisse erst einmal verifiziert werden, um die Charge der gelieferten Substanz auf ihre beschriebene Wirksamkeit zu testen. Hierzu wurden die Colo205-Zellen für 24 h mit APG350 stimuliert und deren Viabilität mittels MTS-Assay bestimmt. Als Vergleichssubstanzen wurden trimeres TRAIL sowie zwei ähnlich wirkende hexamere TRAIL-Formen (APG780 und APG861) verwendet. Die quantitative Beziehung zwischen den untersuchten Substanzen in Abhängigkeit von deren Dosis wurde graphisch als Dosis-Wirkungskurve dargestellt und die mittlere effektive Konzentration (EC50-Wert) für jede Substanz ermittelt (Abbildung 3.1).

Übereinstimmend mit den Daten von Gieffers *et al.* wurde gezeigt, dass das hexamere APG350 Zelltod in Colo205-Zellen induziert. Die Auswertung des MTS-Assays zeigt, dass die Zellviabilität von Colo205 mit APG350 konzentrationsabhängig reduziert wurde. Der EC50-Wert war für APG350 mit 21,4 ng/ml höher als in der vorangegangenen Publikation mit einem Wert von 10 ng/ml. Hingegen reduzierte die Stimulation der Zellen mit trimeren TRAIL die Viabilität stärker bei einer Konzentration von 12 ng/ml, sodass sich daraus ein geringerer EC50-Wert von 9,0 ng/ml ergab. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve für hexamerer APG780 und hexamerer APG861 verdeutlicht, dass beide Substanzen mit 41,40 ng/ml und 30,35 ng/ml ähnlich wie das hexamere APG350 die Viabilität der Colo205-Zellen verminderten (Abbildung 3.1).

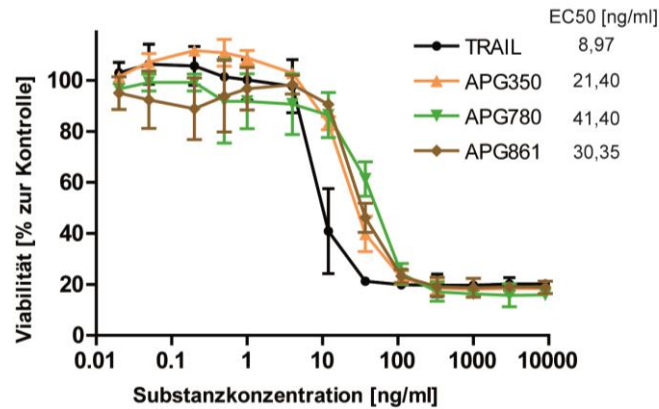


Abbildung 3.1: Trimeres TRAIL und hexavalente TRAIL-Formen reduzieren die Viabilität in Colo205-Zellen.

1×10^4 Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL, APG350, APG780 oder APG861 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTS-Assay bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen normiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm SD$).

In den nachfolgenden Experimenten wurden PDAC-Zellen (1×10^4 Zellen; 96-Loch-Platte) für 24 h mit TRAIL, mit APG350, mit APG780 oder mit APG861 in gleicher massenbezogenen Konzentration (ng/ml) behandelt. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden zwei verschiedene Zytotoxizitätsassays (MTS-Assay und Kristallviolett-Färbung) verwendet.

Die in Abbildung 3.2 graphisch dargestellten Ergebnisse legen dar, dass die drei untersuchten PDAC-Zelllinien unterschiedlich stark auf die verwendeten Reagenzien mit Zelltod reagierten (Abbildung 3.2). Während alle vier Substanzen in ähnlichem Maß die Viabilität in PancTul-Zellen reduzierten (Abbildung 3.2 A, B), zeigte in Colo357- und Panc89-Zellen die TRAIL-Stimulation einen signifikanten Unterschied in der Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Stimulation der Zellen mit APG350, APG780 und APG861 (Abbildung 3.2 C-F). Diese Beobachtungen wurden auch bei der Betrachtung der EC50-Werte für alle Substanzen deutlich. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen zeigten sich PancTul-Zellen deutlich resistenter, gefolgt von Panc89- und Colo357-Zellen (Trauzold et al., 2003; Lemke et al., 2010).

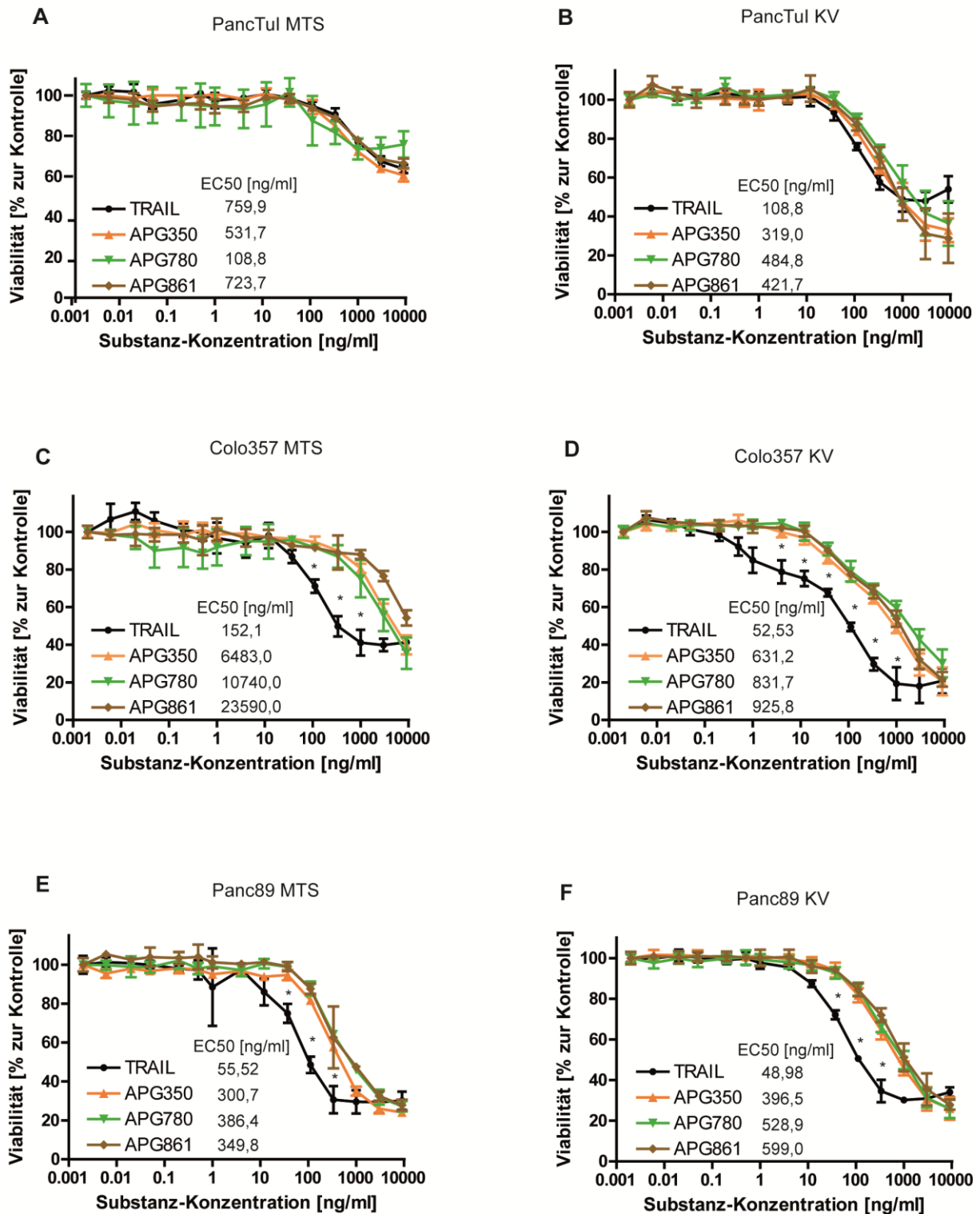


Abbildung 3.2: Vergleich der Behandlung von verschiedenen TRAIL-Formen auf PDAC-Zelllinien.

1x10⁴ Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL, APG350, APG780 oder APG861 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTS-Assay (A, C, E) und Kristallviolett-Färbung (B, D, F) bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen normiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen (n=6 ± SD).

Da trimeres TRAIL nach Bindung an die membranständigen Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 den apoptotischen Signalweg in PDAC-Zellen induziert, wurde in dem nachfolgenden Experiment die Aktivierung des apoptotischen Signalweges durch hexameren APG350 in den sensitiven Colo357- und Panc89-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Prozessierung der Initiatorcaspase-8 sowie die Spaltung der beiden Caspasesubstrate BID und PARP im Western Blot nach Stimulation mit je 100 ng/ml trimeren TRAIL, hexameren APG350, hexameren APG780 bzw. hexameren APG861 analysiert. Zur Kontrolle wurde auch der Einfluss von den verwendeten TRAIL-Varianten auf die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 untersucht.

Wie in Abbildung 3.3 ersichtlich wird, konnte in den untersuchten Colo357- und Panc89-Zellen die Expression von beiden Todesrezeptoren gezeigt werden. Der Western Blot Nachweis für beide Zelllinien macht sichtbar, dass die Behandlung keinen Einfluss auf die Expression dieser besaß (Abbildung 3.3). Alle verwendeten TRAIL-Varianten konnten eine vergleichbar starke Spaltung der Caspase-8 in beiden Zelllinien induzieren. Da PDAC-Zellen den Typ-II-Zellen zugeordnet werden, wurde im Folgenden die BID-Spaltung, die die Aktivierung des mitochondrialen Weges der apoptotischen Signaltransduktion einleitet, untersucht. Es konnte für die verwendeten Zelllinien gezeigt werden, dass trimeres TRAIL deutlicher stärker als die hexameren TRAIL-Varianten BID induziert. Um nachfolgend die Aktivierung der Effektorcaspase-3 zu untersuchen, wurde die Spaltung von PARP, das als Indikator für aktive Caspase-3 dient, nachgewiesen. Das Western Blot Ergebnis macht deutlich, dass alle TRAIL-Formen die PARP-Spaltung in den untersuchten Colo357- und Panc89-Zellen induzierten. Jedoch ist diese Spaltung stärker nach der Stimulation mit trimeren TRAIL im Vergleich zu hexameren TRAIL induziert (Abbildung 3.3). Die Ergebnisse bestätigen die nachgewiesene Reduktion der Viabilität nach trimeren TRAIL in den sensitiven Zelllinien (Abbildung 3.2).

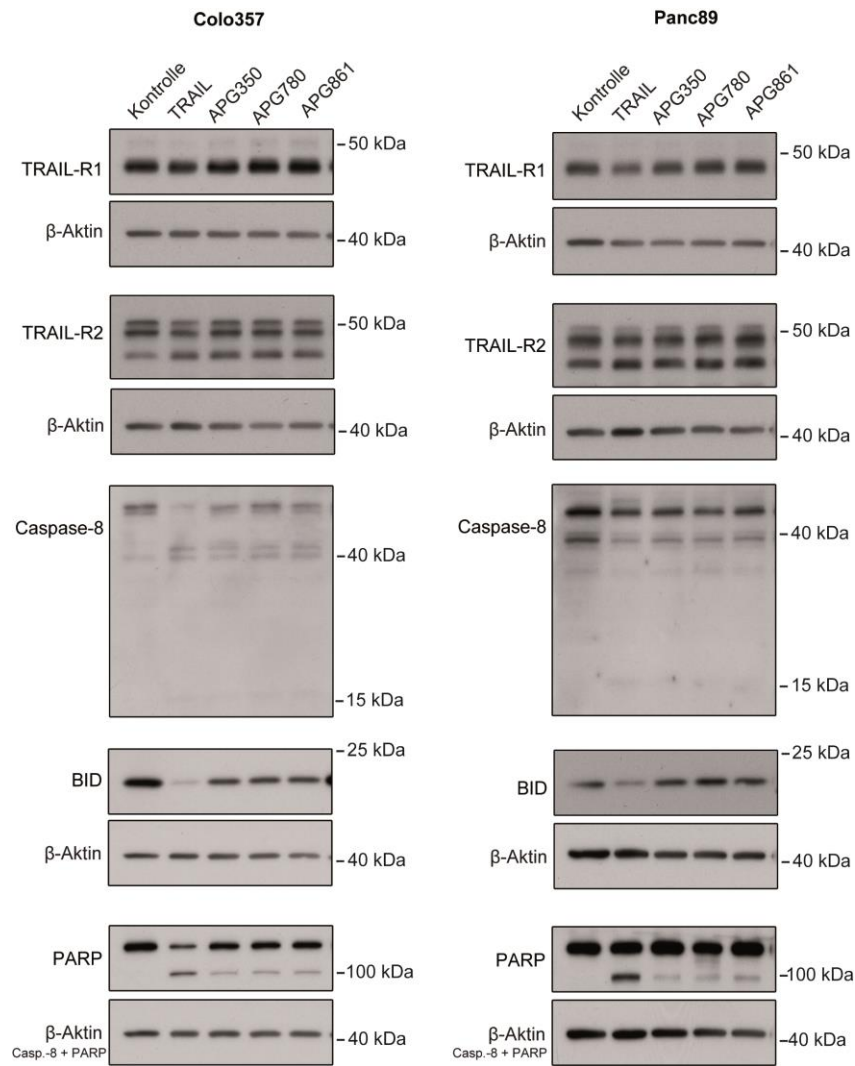


Abbildung 3.3: TRAIL-Formen induzieren Apoptose in Colo357- und Panc89-Zellen.

2,5 x 10⁵ Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit 100 ng/ml TRAIL, APG350, APG780 oder APG861 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Gesamtzelllysat der PDAC-Zellen wurde die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2, die Prozessierung der Initiatorcaspase-8 sowie die Spaltung der Caspase-Substrate BID und PARP mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β-Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Struktur von trimeren TRAIL und hexameren APG350 und der sich daraus ergebenden Unterschiede in der Multimerisierung der TRAIL-Rezeptoren, wurde nachfolgend ein Vergleich der Wirkung beider Substanzen bei identischer stoffmengenbezogener Konzentration (nmol/l) vorgenommen. Das Ziel des nächsten Experimentes war es, die Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade durch trimeres TRAIL bzw. durch hexameren APG350 in äquimolarer Konzentration in der resistenten Zelllinie PancTul und in der sensitiven Zelllinie Colo357 zu untersuchen.

Die Ergebnisse des Kristallviolett-Assays zeigen, dass das hexamere APG350 die Viabilität der untersuchten Zellen vergleichbar wie das trimere TRAIL verminderte (Abbildung 3.4). Diese Untersuchung bestätigt, dass beide TRAIL-Varianten bei gleicher stoffmengenbezogenen Konzentration ähnlich biologisch aktiv waren und vergleichbar stark Zelltod in den getesteten Zelllinien induzierten. Wie bereits in der Abbildung 3.2 gezeigt, konnte auch hier festgestellt werden, dass Colo357-Zellen sensitiver als PancTul-Zellen gegenüber der TRAIL-Behandlung und weiterhin auch gegenüber der APG350-Behandlung waren (Abbildung 3.4).

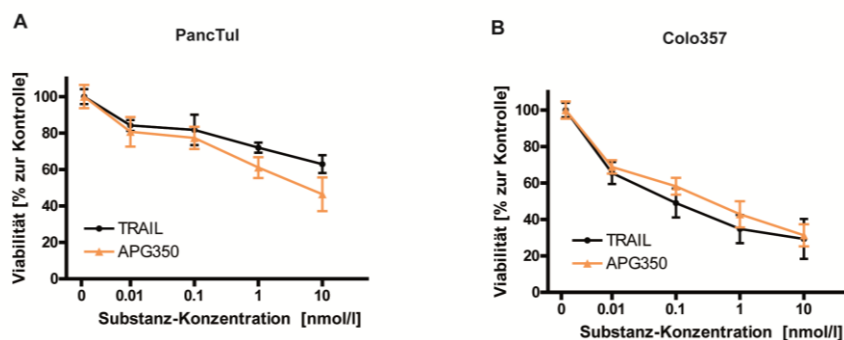


Abbildung 3.4: Untersuchung der apoptotischen Wirkung von trimeren TRAIL und hexameren APG350 in PDAC-Zellen.

1×10^4 PancTul-Zellen (A) oder Colo357-Zellen (B) wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL oder APG350 in den angegebenen äquimolaren Konzentrationen stimuliert. Die Zellviabilität wurde mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen normiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm \text{SD}$).

In Analogie zum Nachweis der Wirkung von trimeren TRAIL und hexameren APG350 bei identischer massenbezogenen Konzentration (ng/ml), wurde auch hier die Aktivierung des apoptotischen Signalweges durch die zwei TRAIL-Varianten bei gleicher stoffmengenbezogenen Konzentration (nmol/l) untersucht.

Wie in der Abbildung 3.5 dargestellt, induzierte in den resistenten PancTul-Zellen das hexamere APG350 eine vergleichbar starke Prozessierung der Initiatorcaspase-8 und nachfolgend eine vergleichbar ausgeprägte Spaltung der beiden Caspase-Substrate BID und PARP wie das trimere TRAIL. Dagegen konnte in den sensitiven Colo357-Zellen Unterschiede in den aktiven Substraten beobachtet werden. Die TRAIL-Stimulation führte zur vermehrten Spaltung von Caspase-8, BID und PARP in diesen Zellen im Vergleich zur Stimulation mit APG350 (Abbildung 3.5).

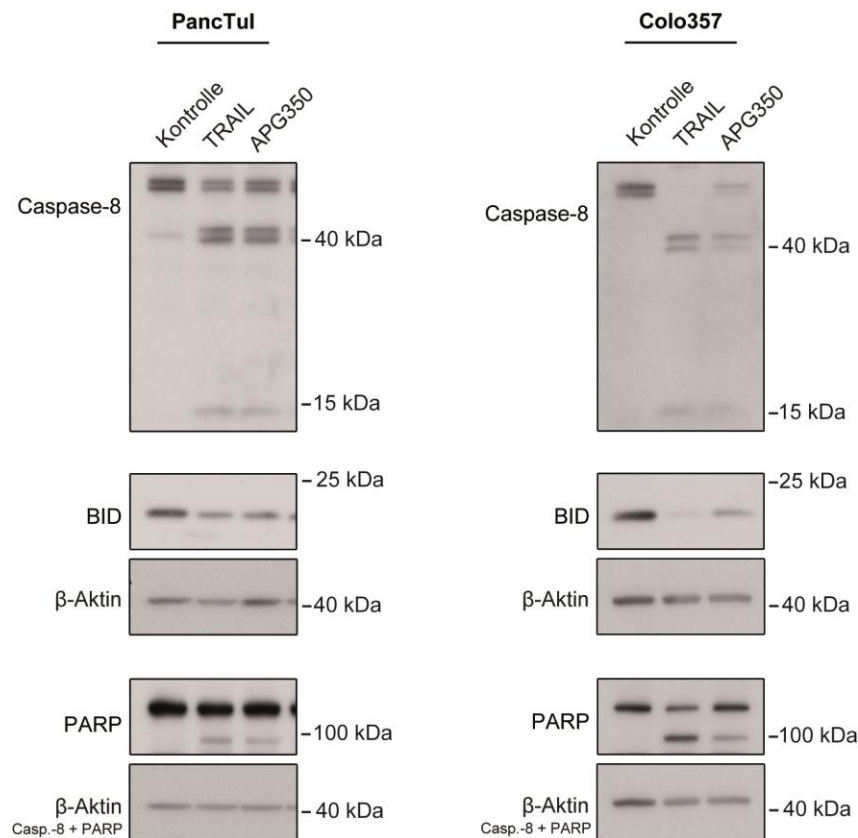


Abbildung 3.5: Apoptotische Wirkung von TRAIL und APG350 in PDAC-Zellen.

2,5 x 10⁵ PancTul- bzw. Colo357-Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit je 1,7 nM TRAIL oder APG350 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Gesamtzelllysat der PDAC-Zellen wurde die Prozessierung der Initiatorcaspase-8 sowie die Spaltung der Caspase-Substrate BID und PARP mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β-Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

3.1.2 Überexpression von Bcl-xL schützt PDAC-Zellen vor APG350-vermittelter Apoptose

Um die nicht-apoptotischen Effekte von trimeren TRAIL bzw. hexameren APG350 näher zu untersuchen, wurde Experimente mit PDAC-Zellen durchgeführt, die durch die stabile Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL vor Apoptose geschützt sind. Hierfür wurden Colo357-Zellen mit einem Bcl-xL-Expressionsvektor stabil transfiziert (Colo357 Bcl-xL). Zur Kontrolle wurden die gleichen Colo357-Zellen mit einem leeren Vektor transfiziert (Colo357-Vektor). Aufgrund einer Viruskontamination waren diese resistenten Zellen in der Arbeitsgruppe nicht mehr vorhanden und mussten neu hergestellt werden.

Die Expression von Bcl-xL wurde in den neuen Zellklonen überprüft und mit dem Bcl-xL-Level in verschiedenen PDAC-Zellen verglichen. Wie in Abbildung 3.6 ersichtlich, war die Expression von Bcl-xL in Colo357 Bcl-xL-Zellen stark erhöht. Weiterhin wiesen die Zelllinien PancTul und Capan 2 eine natürlich erhöhte Bcl-xL-Expression im Vergleich zu anderen PDAC-Zelllinien auf (Abbildung 3.6).

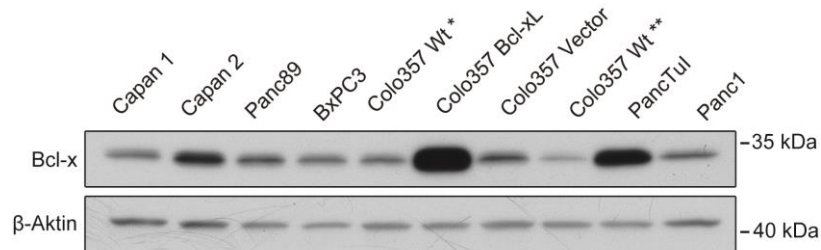


Abbildung 3.6: Expression von Bcl-xL in diversen PDAC-Zelllinien.

$2,0 \times 10^5$ Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und 24 h später lysiert (*=Colo357 batch von 1992, **=Colo357 batch von 2012). Die Expression von Bcl-xL wurde im Gesamtzelllysate der PDAC-Zellen mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β -Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

In dem nachfolgenden Experiment wurden Colo357-Vektor- und Colo357 Bcl-xL-Zellen auf ihre Sensitivität gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose überprüft. Hierfür wurden die beiden Zelllinien mit TRAIL für 24 h stimuliert und im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung.

Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, war die Zellviabilität in Colo357 Bcl-xL-Zellen im Vergleich zu Colo357-Vektor-Zellen und zu parentalen Colo357-Zellen als Folge der Behandlung mit TRAIL reduziert (Abbildung 3.7).

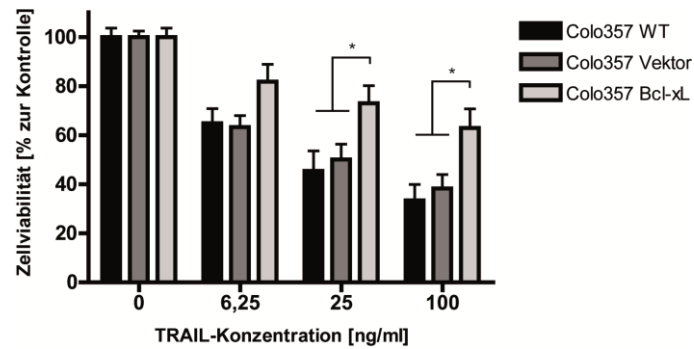


Abbildung 3.7: Apoptotische Wirkung von trimeren TRAIL auf sensitive und resistente PDAC-Zellen.

1×10^4 Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen normiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm SD$). $^* = p < 0,05$.

Im folgenden Experiment untersuchten wir, ob sich das trimere TRAIL und das hexamere APG350 hinsichtlich der Fähigkeit zur Induktion der apoptotischen Signalkaskade unterscheiden. Dazu wurden Colo357-Vektor- und Colo357 Bcl-xL-Zellen für 24 h mit TRAIL bzw. APG350 in äquimolaren Konzentrationen stimuliert und die Zellviabilität mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, induzierten beide Substanzen dosisabhängig Zelltod in den verwendeten Zelllinien. Gegenüber den Colo357-Vektor-Zellen war die Zelltodinduktion in den Colo357 Bcl-xL-Zellen signifikant verringert (Abbildung 3.8).

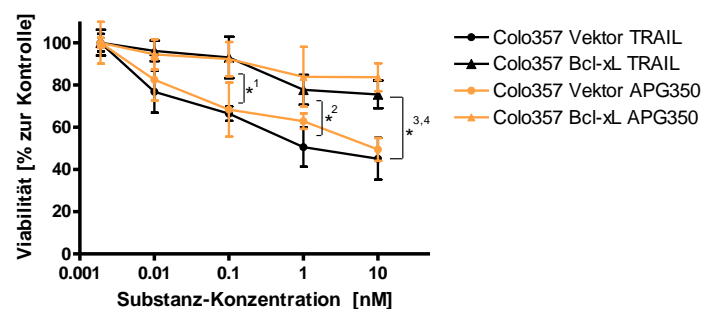


Abbildung 3.8: Einfluss der TRAIL-Formen auf die Viabilität von resistenten PDAC-Zellen.

1×10^4 Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL oder APG350 in den angegebenen Molaritäten behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen normiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm SD$). $^* = p > 0,05$ 1) TRAIL-Stimulation, 2) TRAIL- Stimulation, 3) TRAIL- Stimulation, 4) APG350- Stimulation.

Parallel zur Quantifizierung des Zelltodes wurde die Aktivierung der apoptotischen Signalwege durch TRAIL bzw. APG350 (100 ng/ml) anhand der Spaltung von Caspase-8, BID und PARP im Western Blot untersucht.

Sowohl in den Apoptose-sensitiven Colo357-Vektor-Zellen als auch in den Apoptose-resistenten Colo357 Bcl-xL-Zellen konnte eine Spaltung der Initiatorcaspase-8 durch TRAIL bzw. durch APG350 beobachtet werden (Abbildung 3.9). Wie bereits erwähnt, benötigen PDAC-Zellen für die Induktion der Apoptose den mitochondrialen Apoptoseweg (Typ-II-Zellen). Um die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges nachzuweisen, wurde im Folgenden die Spaltung des Substrates BID untersucht. Es konnte für beide untersuchten Zelllinien gezeigt werden, dass das trimere TRAIL die Spaltung von BID induzierte. Aufgrund des eingebrachten Bcl-xL-Expressionsvektors zeigten die Colo357 Bcl-xL-Zellen eine deutlich erhöhte Expression von Bcl-xL im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Colo357-Vektor-Zellen. Das hatte zur Folge, dass die Spaltung des Substrates PARP in den Bcl-xL überexprimierenden Colo357 Zellen weniger ausgeprägt war (Abbildung 3.9). Somit wurde gezeigt, dass aufgrund der Überexpression von Bcl-xL die apoptotische Signalkaskade post-mitochondrial unterbunden ist, was zur Hemmung der Apoptose in diesen Zellen führte (Abbildung 3.7, Zellviabilitätsassay).

Bei Betrachtung der APG350-Behandlung wird deutlich, dass die Prozessierung der Caspase-8 und nachfolgend die Spaltung von BID und PARP in den Apoptose-sensitiven Colo357-Vektor-Zellen weniger ausgeprägt induziert wurden. Dieser Unterschied konnte in den Apoptose-resistenten Bcl-xL überexprimierenden Colo357-Zellen nicht beobachtet werden. In diesen Zellen wurde die PARP-Spaltung weniger induziert, was zur verminderten Sensitivität gegenüber der TRAIL- bzw. APG350-vermittelten Apoptose aufgrund der Überexpression von Bcl-xL führte (Abbildung 3.9).

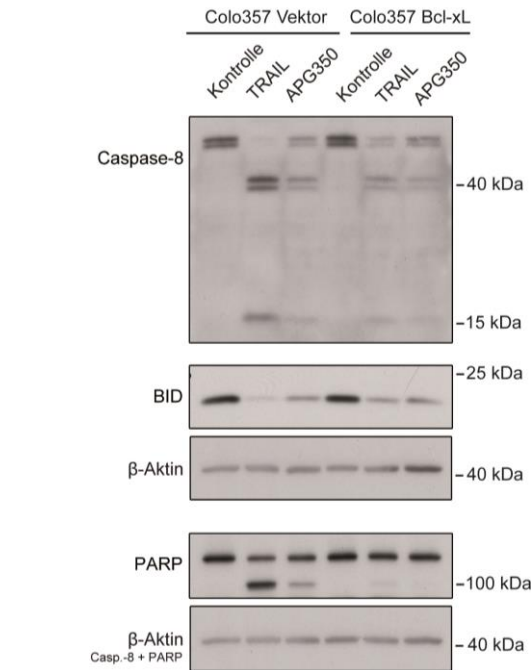


Abbildung 3.9: Bcl-xL schützt PDAC-Zellen vor TRAIL- bzw. APG350-vermittelter Apoptose.

2,5 x 10⁵ Colo357-Vektor- bzw. Colo357 Bcl-xL-Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit 100 ng/ml TRAIL oder APG350 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Gesamtzelllysate der PDAC-Zellen wurde die Prozessierung der Initiatorcaspase-8 sowie die Spaltung der Caspase-Substrate BID und PARP mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β -Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

3.1.3 APG350 induziert nicht-apoptotische Signalwege in PDAC-Zellen

Es ist bekannt, dass die Behandlung mit trimeren TRAIL neben der Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade auch nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Signalwege in PDAC-Zellen induziert (Trauzold et al., 2006; Lemke et al., 2010).

Um die pro-inflammatorische Antwort durch die hexameren TRAIL-Formen näher zu charakterisieren, wurde nachfolgend die Aktivierung von nicht-apoptotischen, pro-inflammatorischen Signalwegen in Ganzzelllysaten mit Hilfe der Western Blot Methode analysiert. Colo357-Zellen wurden für 3 h mit trimeren bzw. hexameren TRAIL in identischer massenbezogener Konzentration (100 ng/ml) stimuliert und anschließend die Unterschiede in der Phosphorylierung von p38, p42/44, JNK und I κ B α untersucht.

Wie Abbildung 3.10 zeigt, führte die Behandlung mit trimeren TRAIL im Vergleich zu hexameren APG350 zu einer stärkeren Phosphorylierung von p38, JNK und I κ B α und somit zu einer stärkeren Aktivierung dieser Signalwege. Hinsichtlich des p42/44-Signalweges war die Phosphorylierung der MAP-Kinase p42/44 marginal, was auf die geringe Aktivierung dieses Signalweges hindeutet (Abbildung 3.10).

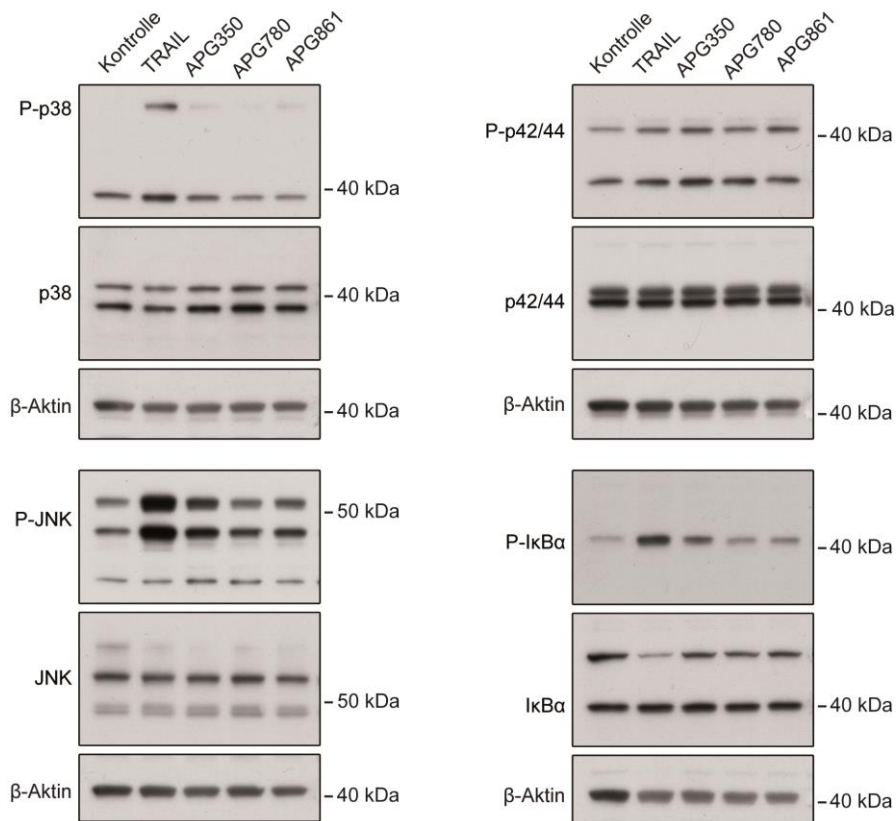


Abbildung 3.10: Untersuchung der nicht-apoptotischen Wirkung von diversen TRAIL-Formen.

2,5 x 10⁵ Colo357-Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und für 3 h mit je 100 ng/ml TRAIL, APG350, APG780 oder APG861 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Gesamtzelllysat der PDAC-Zellen wurde die Phosphorylierung und die Nicht-Phosphorylierung von p38, p42/44, JNK sowie IκBα mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β-Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

Im Folgenden Experiment wurde die nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Antwort in Colo357-Zellen mit TRAIL bzw. APG350 bei gleicher stoffmengenbezogenen Konzentration der Substanzen untersucht.

Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, führte die 3-stündige Behandlung mit APG350 zu einer starken Phosphorylierung von IκBα und demnach zu einer Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Während die Induktion des p42/44-Signalweges mit beiden Substanzen vergleichbar stark aktiviert wurde, führte die Behandlung mit trimeren TRAIL zu einer stärkeren ausgeprägten Aktivierung der Signalwege p38 und JNK (Abbildung 3.11).

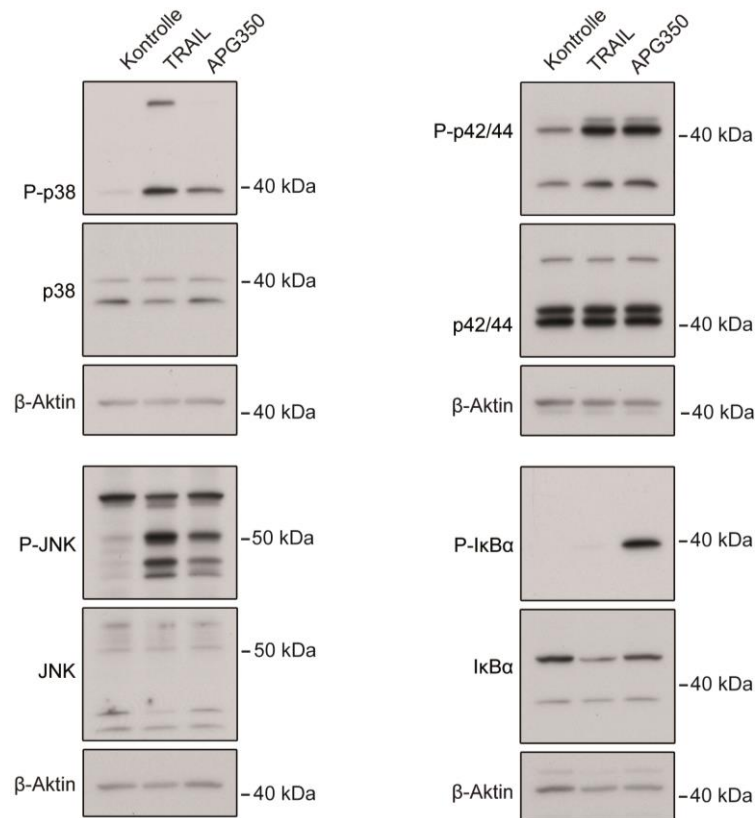


Abbildung 3.11: Proinflammatorische Wirkung von TRAIL und APG350 auf Colo357-Zellen.

$2,5 \times 10^5$ Colo357-Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und für 3 h mit 1,7 nM TRAIL oder APG350 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Gesamtzelllysat der PDAC-Zellen wurde die Phosphorylierung und die Nicht-Phosphorylierung von p38, p42/44, JNK sowie IκBα mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β-Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

Um die nicht-apoptotische, pro-inflammatorische Signaltransduktion ohne den Einfluss der Apoptose untersuchen zu können, wurden die resistenten Colo357 Bcl-xL-Zellen für 3 h mit trimeren TRAIL oder mit hexameren APG350 (äquimolare Konzentration) stimuliert und die Phosphorylierung von p38, p42/44, JNK und IκBα mittels Western Blot Analyse untersucht. Parallel dazu wurde der Versuchsansatz mit den sensitiven Colo357-Vektor-Zellen durchgeführt und die Ergebnisse mit den Bcl-xL überexprimierenden Zellen verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Signalwege p38, JNK und NF-κB deutlich in Colo357 Bcl-xL-Zellen vermindert durch hexameren APG350 aktiviert wurden (Abbildung 3.12).

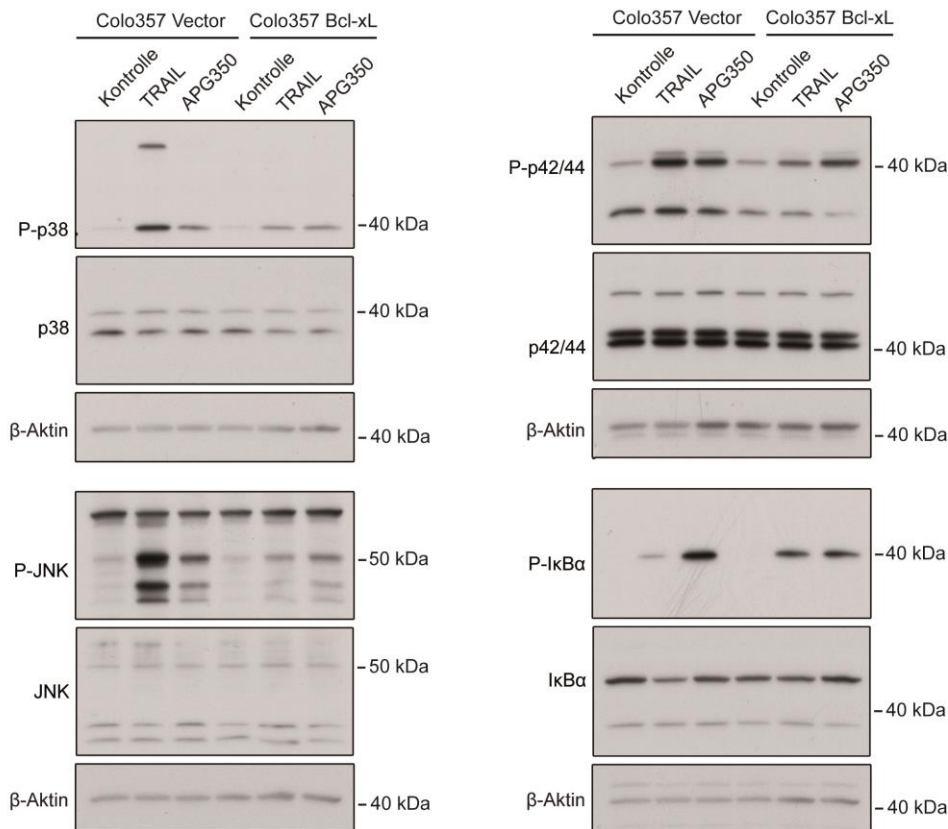


Abbildung 3.12: Einfluss von Bcl-xL auf die Behandlung von resistenten PDAC-Zellen.

2,5 x 10⁵ Colo357-Vektor- bzw. Colo357 Bcl-xL-Zellen wurden in Löcher einer 6-Loch Platte ausgesät und für 3 h mit 1,7 nM TRAIL oder APG350 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Gesamtzelllysat der PDAC-Zellen wurde die Phosphorylierung und die Nicht-Phosphorylierung von p38, p42/44, JNK sowie IκBα mittels Western Blot Technik untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β-Aktin als Ladekontrolle bestimmt.

3.1.4 APG350 induziert IL-8 in PDAC-Zellen

Die Aktivierung des NF-κB -Signalweges führt zur Hemmung der Apoptose und parallel dazu zur Induktion der Expression des Chemokines IL-8 (Trauzold et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die nicht-apoptotische Antwort nach Behandlung mit hexameren APG350 im Vergleich zu trimeren TRAIL vermehrt oder vermindert induziert wird, wurden PancTul-, Colo357- und Panc89-Zellen mit identischer massenbezogenen Konzentration der oben genannten Substanzen für 24 h stimuliert und die Mengen des Zytokins IL-8 im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die pro-inflammatorische Wirkung der zwei weiteren TRAIL-Varianten, APG780 und APG861, wurde parallel dazu untersucht. Die Ergebnisse des IL-8 ELISAs zeigen, dass die Stimulation der Zellen zu einer drastischen IL-8-Induktion in den getesteten Zelllinien führte (Abbildung 3.13). So konnte in den resistenten PancTul-Zellen gezeigt werden, dass bei identischer massenbezogenen Konzentration der untersuchten TRAIL-Formen eine vergleichbare Menge an IL-8 von den Zellen sekretiert

wurde (Abbildung 3.13A). In den sensitiven Colo357- und Panc89-Zellen führte die Stimulation der Zellen mit trimeren TRAIL in geringer massenbezogenen Konzentration zu einer deutlich stärkeren Induktion von IL-8 als die Stimulation der Zellen mit den hexameren TRAIL-Formen (Abbildung 3.13B-C).

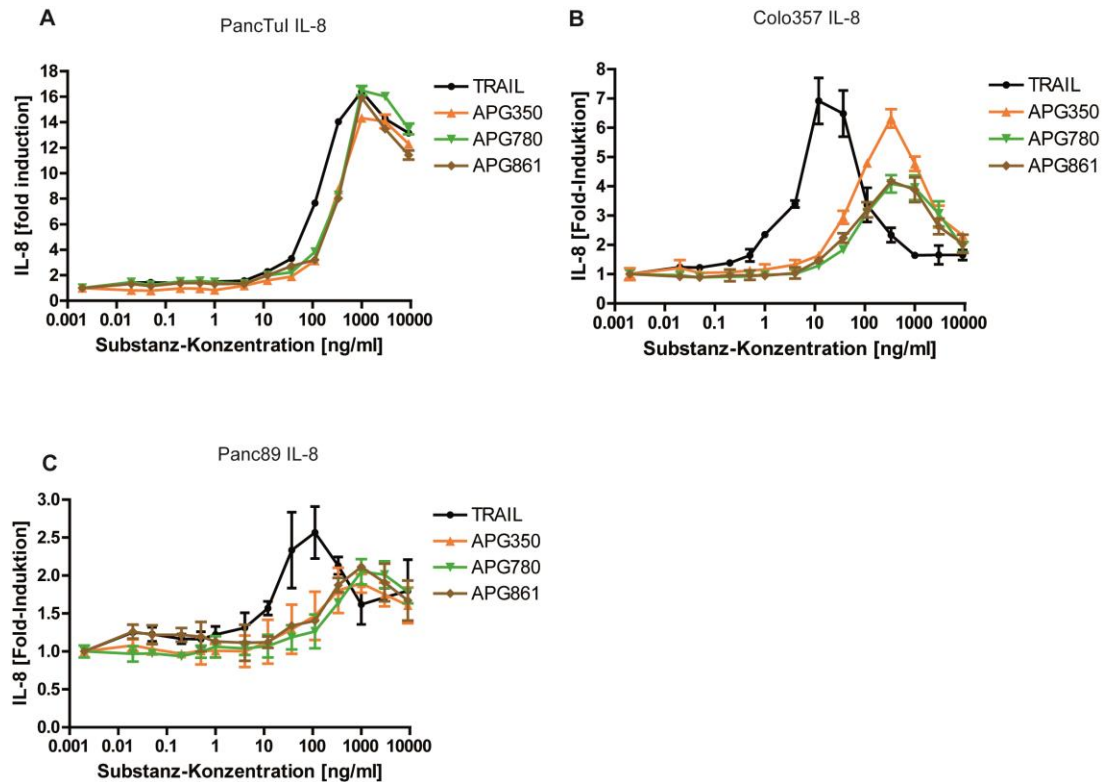


Abbildung 3.13: Untersuchung der nicht-apoptotischen Wirkung von verschiedenen TRAIL-Formen auf PDAC-Zellen.

1×10^4 Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL, APG350, APG780 oder APG861 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Das IL-8 Level wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte von unbehandelten Zellen normiert (Fold-Induktion). Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm SD$).

Im folgenden Experiment wurde ein Vergleich der IL-8 Sekretion von trimeren TRAIL und hexameren APG350 bei äquimolarer Konzentration in den resistenten PancTul-Zellen und den sensitiven Colo357-Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden für 24 h stimuliert und die IL-8 Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, konnte in beiden Zelllinien gezeigt werden, dass die Sekretion des Zytokins stärker nach Behandlung mit APG350 induziert wurde. Während in den resistenten Zellen die Substanz in hoher Konzentration zur vermehrten IL-8 Induktion

fürhte, produzierten die sensitiven Zellen geringere Menge an IL-8 (Abbildung 3.14 A-B). Dieser glockenartige Kurvenverlauf der IL-8-Induktion für die Colo357-Zellen konnte bereits in der Publikation von Lemke *et al.* beobachtet werden, was die Annahme bestätigt, dass aufgrund der zunehmenden Zelltodinduktion die IL-8 Sekretion reduziert wurde (Abbildung 3.14; Lemke *et al.*, 2010).

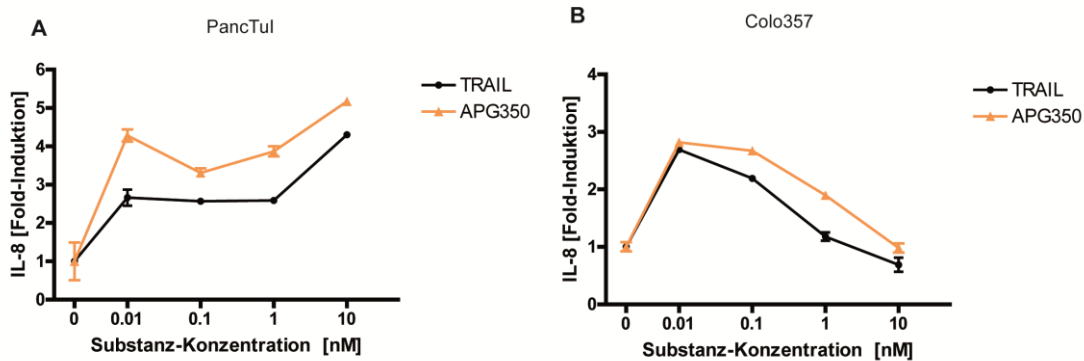


Abbildung 3.14: Trimeres TRAIL bzw. hexamerer APG350 induzieren IL-8 in PDAC-Zellen.

1×10^4 Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch-Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL oder APG350 in den angegebenen molaren Konzentrationen behandelt. Die IL-8 Level wurden im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte von unbehandelten Zellen normiert (Fold-Induktion). Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm SD$).

Um die pro-inflammatorische Antwort ohne den Einfluss der Zelltodinduktion zu untersuchen, wurden für die Untersuchungen der APG350-induzierten IL-8 Sekretion die Apoptose-resistenten Bcl-xL überexprimierenden Colo357-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 24 h mit trimeren TRAIL oder hexameren APG350 in identischer stoffmengenbezogenen Konzentration stimuliert und im Zellkulturüberstand der untersuchten Zellen die Mengen an IL-8 bestimmt. Parallel dazu wurde die pro-inflammatorische Wirkung von TRAIL bzw. APG350 auf Leervektor-transfizierte Colo357-Zellen bestimmt.

Wie in Abbildung 3.15 dargestellt, führte die Behandlung mit APG350 zu einer drastischen IL-8 Induktion in den resistenten Colo357 Bcl-xL-Zellen im Vergleich zu den sensitiveren Colo357-Vektor-Zellen. Weiterhin konnte für beide Zelllinien gezeigt werden, dass die Menge an IL-8 nach Stimulation mit hexameren APG350 höher war als nach Stimulation mit trimeren TRAIL (Abbildung 3.15).

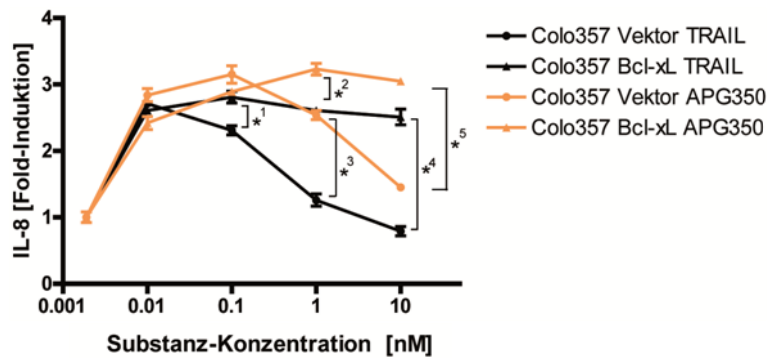


Abbildung 3.15: Beide TRAIL-Formen induzieren verstärkt IL-8 in den Colo357 Bcl-xL-Zellen.

1×10^4 Colo357-Vektor- bzw. Colo357-Zellen wurden in Löcher einer 96-Loch Platte ausgesät und für 24 h mit TRAIL oder APG350 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die IL-8 Level wurden im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Werte der behandelten Zellen wurden auf die Werte der unbehandelten Zellen normiert (Fold-Induktion). Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Versuchen ($n=6 \pm SD$). $*=p>0,05$. 1) TRAIL-Stimulation, 2) APG350-Stimulation, 3) TRAIL-Stimulation, 4) TRAIL-Stimulation, 5) APG350-Stimulation.

3.2 *in vivo*-Analysen

3.2.1 Einfluss der konservativen APG350-Therapie auf PDAC-Tumore und die Metastasierung

Der konservative Versuchsansatz wurde mit den drei humanen Pankreaskrebszelllinien PancTul, Colo357-Vektor und Colo357 Bcl-xL durchgeführt. Tumorzellen (1×10^6 / Tier), eingebettet in Matrigel, wurden in das Pankreas von immundefizienten Mäusen inokuliert. Nach der Operation wurden die Tiere randomisiert in drei Gruppen eingeteilt. Die konservative Therapie wurde vier Tage nach Zellinokulation mit PBS, TRAIL (3 mg/kg KGW) oder APG350 (3 mg/kg KGW) i.p. einmal täglich für fünf Tage ausgeführt.

3.2.1.1 APG350 reduziert das Gewicht der PDAC-Primärtumore

Im ersten Tierversuch wurde die Pankreastumorzelllinie PancTul verwendet, da APG350 in dieser Zelllinie Apoptose *in vitro* induzierte. Der konservative Versuchsansatz hatte eine Dauer von 33 Tagen und ist graphisch in Abbildung 3.16 dargestellt.

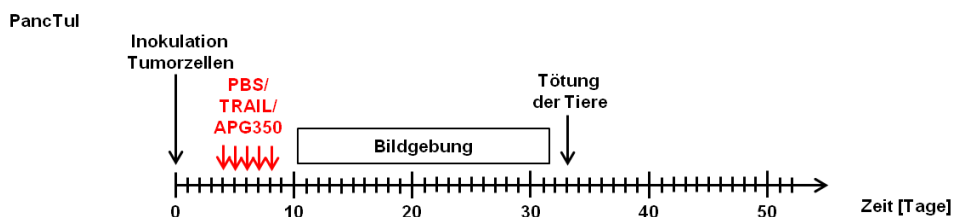


Abbildung 3.16: Übersicht des Tierversuchs mit der Zelllinie PancTul in der konservativen Therapie.

Während der Behandlungsphase wurde am ersten - (Tag 1) und letzten Tag (Tag 5) die Konzentration von TRAIL bzw. APG350 im Blut von Mäusen mit gleichnamiger Behandlung mittels ELISA bestimmt. Der Blutspiegel der behandelten Tiere wurde mit dem Blutspiegel von Kontrolltieren verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die TRAIL-behandelten Mäuse an beiden Bestimmungstagen eine TRAIL-Konzentration von rund 2 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen (Abbildung 17-A). Demgegenüber war die gemessene Serumkonzentration von APG350 am ersten Messtag mit rund 8 $\mu\text{g/ml}$ um das vier-fache höher und stieg am fünften Behandlungstag um das 2,4 fache an (Abbildung 17-B).

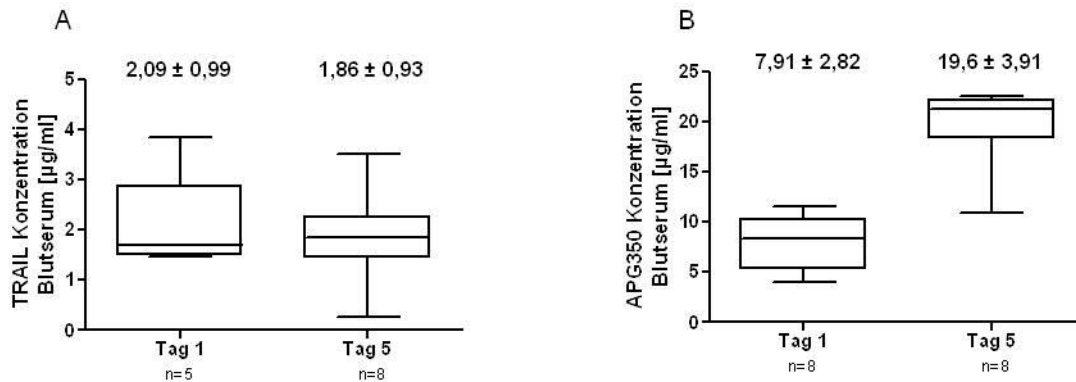


Abbildung 3.17: Bestimmung des Serumspegels von TRAIL und APG350.

PancTul-Zellen wurden orthotop in den Pankreas von SCID beige Mäusen inokuliert und 4 Tage später startete die Behandlung (5 Tage, 1x pro Tag) mit trimeren TRAIL (3 mg/kg KGW), hexameren APG350 (3 mg/kg KGW) bzw. mit PBS. Am ersten (Tag 1) und letzten Behandlungstag (Tag 5) wurde mittels Schwanzvenenpunktion 30 Minuten nach i.p. Applikation von PBS, TRAIL oder APG350 100 µl Blut entnommen. Es wurden zwei ELISAs zur Bestimmung der Konzentration von (A) TRAIL und (B) APG350 im Blutserum verwendet. Das Serum der PBS-Gruppe diente dabei als Kontrolle.

Im Anschluss an die fünftägige Behandlung wurden die Tumore mittels Kleintierultraschall lokalisiert und das Tumolvolumen an vier unterschiedlichen Messtagen, beginnend am postoperativen Tag 12 (POD 12) und endend am Tag 33 (POD 33) bestimmt.

Die nicht-invasive Ultraschalldiagnostik erlaubt das Tumorstadium an lebenden Mäusen im Verlauf des Versuches zu beobachten. Weiterhin gibt die Methode Aufschluss über die akkurate Lokalisation und Morphologie der Tumore und erlaubt eine Volumenbestimmung der Tumore innerhalb der Gewebe.

Die in Abbildung 3.18-A dargestellten Bilder zeigen für jede Gruppe ein Mausabdomen. Zu sehen ist das Wachstum des Primärtumors im Verlauf von 21 Tagen (POD 12 bis POD 33). Während bei allen Tieren an Tag 12 der Tumor ähnlich groß war, wurde ein deutlich größeres Tumolvolumen in der Kontroll-Gruppe (PBS-behandelte Tiere) als in den beiden anderen Gruppen (TRAIL- und APG350-Behandlung) an den Tagen 25 und 33 beobachtet (Abbildung 3.18). Die Auswertung der Volumetrie zeigt, dass die Tumore der APG350-Gruppe signifikant kleiner waren als die Tumore der PBS-Gruppe bzw. die Tumore der TRAIL-Gruppe (*= $p < 0,05$) (Abbildung 3.18-B). Am letzten Versuchstag wurde ein Ganzkörper-MRT an zwei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Der Scan zeigt, dass der Tumor in der APG350-Gruppe deutlich kleiner war als derer in der TRAIL-Gruppe und in der Kontroll-Gruppe (Abbildung 8.1 im Anhang). Am darauffolgenden 33. postoperativen Tag wurde der Versuch beendet und das mediane Tumorgewicht in den drei Behandlungsgruppen ermittelt. Die konservative APG350-Therapie führt zu einer

signifikanten Reduktion der Tumormasse um 62 % im Vergleich zur PBS-Gruppe und um 56,4 % im Vergleich zur TRAIL-Gruppe (Abbildung 3.18-C).

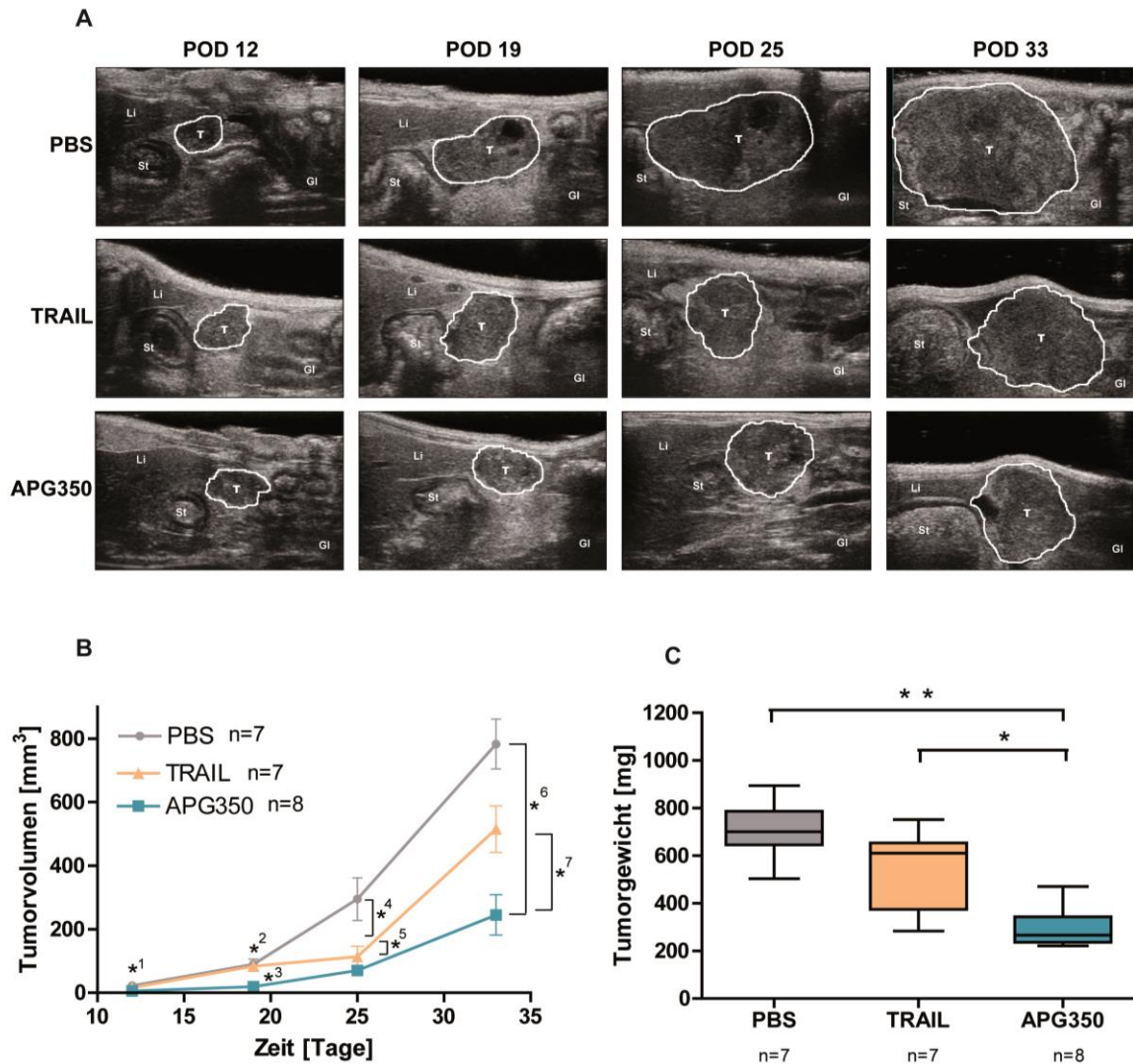


Abbildung 3.18: Effekt der konservativen Therapie von APG350 bzw. TRAIL auf PancTul-Tumore.

1x10⁶ in Matrigel eingebettete PancTul-Zellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert. Nach 4 Tagen begann die konservative Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinanderfolgende Tage. (A) Repräsentative Bilder der vier Ultraschallmessungen (Tag 12, 19, 25 und 33 nach Tumorzellinokulation). (B) Bestimmung des Tumolvolumens mittels Volumetrie. 1) PBS vs. APG350, 2) PBS vs. APG350, 3) TRAIL vs. APG350, 4) PBS vs. TRAIL, 5) PBS vs. APG350, 6) PBS vs. APG350, 7) TRAIL vs. APG350. (C) Tumorgewicht am Endpunkt des Versuchs. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$.

Um den therapeutischen Effekt von APG350 auf die Tumervaskularisierung zu untersuchen, wurde die Ausprägung der Blutgefäßneubildung an den behandelten Primärtumoren analysiert. Dazu wurde eine CD31-Färbung an Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe mittels Immunhistochemie durchgeführt, da CD31 als epithelialer Marker arterielle Gefäße anfärbt. Parallel dazu wurden die Tumore Ki67 gefärbt, da Ki67 als Proliferationsmarker dient.

Wie in Abbildung 3.19 dargestellt, führte die konservative APG350-Therapie zu keiner Veränderung in der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore (Ki67-Färbung). Bei der Betrachtung der CD31-Färbung zeigt sich, dass die CD31-Expression der Gefäßendothelzellen durch die Therapie nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 3.19).

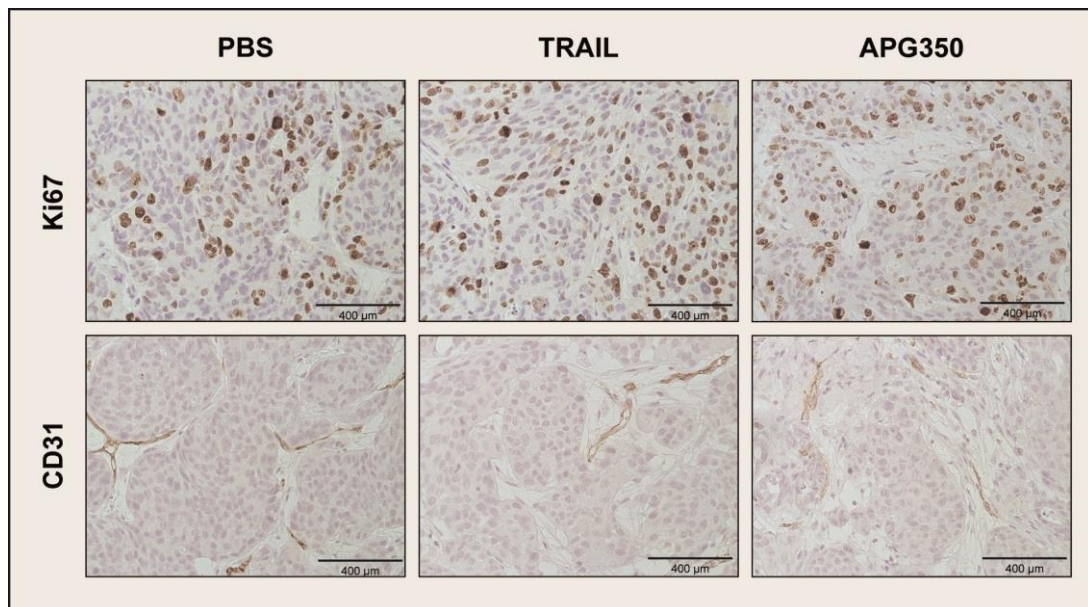


Abbildung 3.19: Einfluss der konservativen Therapie mit APG350 bzw. TRAIL auf die Proliferation und Angiogenese der PancTul-Tumore.

2 µm Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Tumorschnitte wurden mit Antikörper gegen Ki67 bzw. gegen CD31 gefärbt. Skala: Die schwarzen Balken entsprechen 400 µm.

3.2.1.2 Bcl-xL-Überexpression schützt PDAC-Tumore vor APG350-vermittelter Apoptose

Um die therapeutische Wirkung von APG350 auf Apoptose-resistente Pankreastumorzellen zu untersuchen, wurde der gleiche Versuchsaufbau mit den resistenten Colo357 Bcl-xL Zellen und den entsprechenden Kontrollzellen (Colo357-Vektor-Zellen) durchgeführt. Die Überexpression von Bcl-xL in den Colo357 Bcl-xL-Zellen wurde zuvor auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse bestätigt (Abbildung 3.20).

Der Versuchsansatz mit den Colo357-Vektor-Zellen hatte eine Versuchsdauer von 50 Tagen (Abbildung 3.20-A). Hingegen war der Versuchsansatz mit den Colo357 Bcl-xL-Zellen mit 33 Tagen deutlich kürzer und wurde aufgrund der tierschutzethischen Bestimmungen früher beendet (Abbildung 3.20-B).

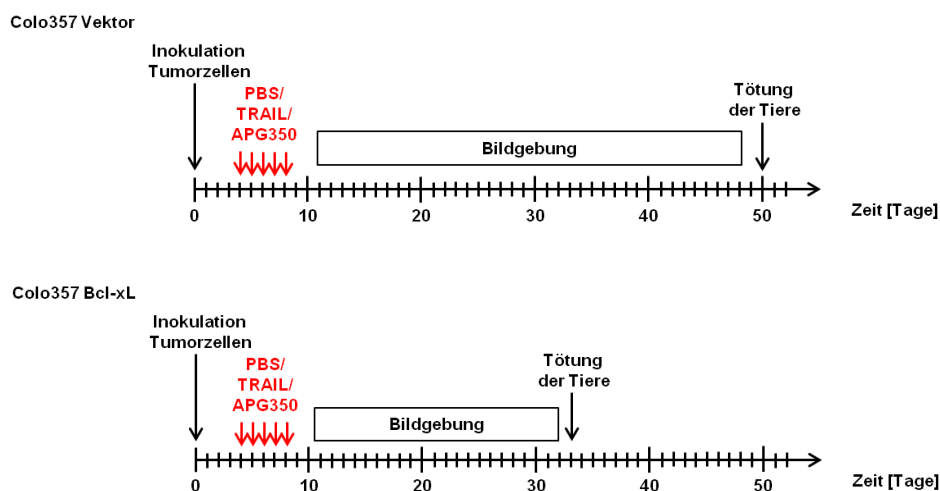


Abbildung 3.20: Übersicht der Tierversuche mit der Zelllinie Colo357-Vektor und der Zelllinie Colo357 Bcl-xL in der konservativen Therapie.

Wie bereits beim PancTul-Versuch durchgeführt, wurde auch in diesen beiden Ansätzen bei den behandelten Tieren der Serumspiegel von APG350- bzw. TRAIL ermittelt.

Wird der Versuchsansatz mit der Zelllinie Colo357-Vektor betrachtet, so hatte die TRAIL-Gruppe am ersten Applikationstag eine TRAIL-Konzentration von rund 0,9 µg/ml. Am fünften Behandlungstag stieg die TRAIL-Konzentration auf rund 1,7 µg/ml an. Bei dem durchgeführten Versuchsansatz mit den Colo357 Bcl-xL-Zellen konnte für die TRAIL-Gruppe gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von TRAIL am ersten Tag bei rund 1,7 µg/ml lag. Die fünf-tägige Behandlung führte zu einem marginalen Anstieg der TRAIL-Konzentration auf rund 2,1 µg/ml in der TRAIL-behandelten Gruppe (Abbildung 3.21 A-B).

Parallel zu den TRAIL-behandelten Mäusen wurde bei den APG350-behandelten Mäusen der APG350-Serumspiegel bestimmt. In beiden Versuchsansätzen war die APG350-Konzentration in der APG350-Gruppe deutlich höher. Tiere mit inokulierten Colo357-Vektor-Zellen wiesen am ersten Tag der konservativen Therapie eine APG350-Blutkonzentration von rund 3,8 µg/ml auf. Die APG350-Konzentration stieg am fünften Applikationstag auf das 3,04-fache (rund 20 µg/ml) an. Mäuse mit Colo357 Bcl-xL-Zellen hatten am ersten Tag der APG350-Therapie eine Konzentration von rund 6,7 µg/ml. Nach fünf Behandlungstagen stieg die Serumkonzentration um das 4,91-fache auf rund 18,7 µg/ml an (Abbildung 3.21 C-D).

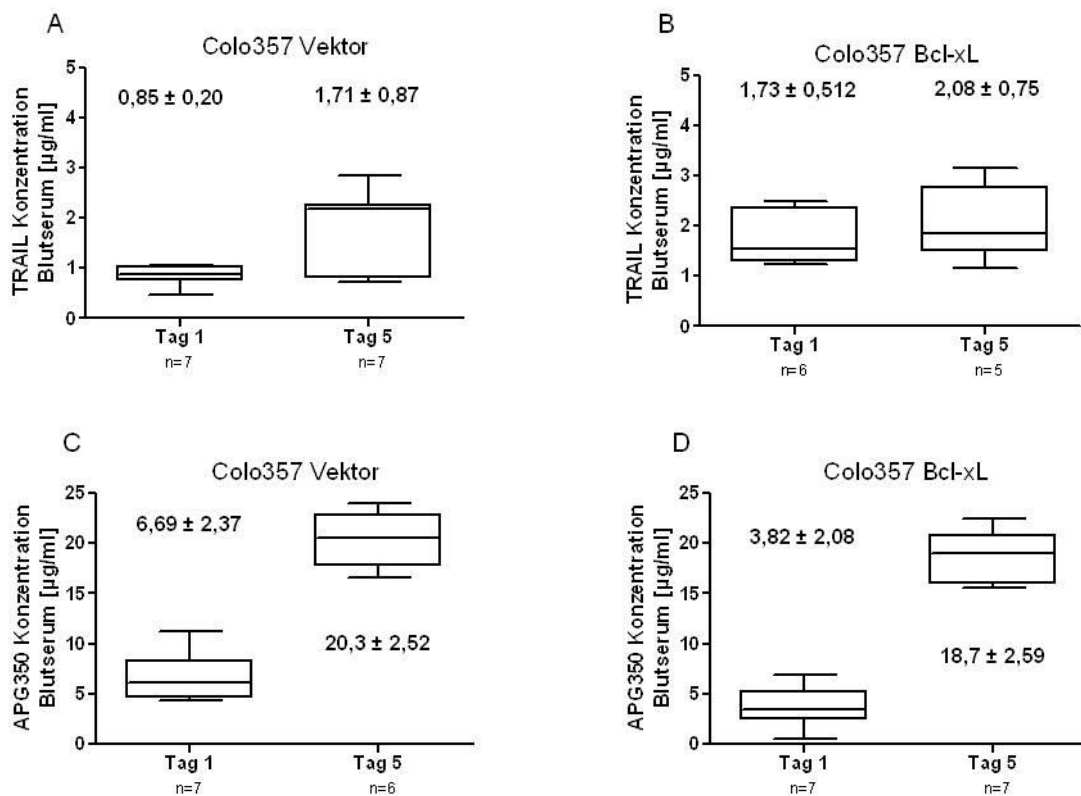


Abbildung 3.21: Bestimmung des Serumspiegels von TRAIL und APG350 an zwei Zeitpunkten.

Colo357-Vektor-Zellen bzw. Colo357 Bcl-xL-Zellen wurden orthotop in den Pankreas von SCID beige Mäusen inokuliert und 4 Tage später erfolgte die konservative Therapie (PBS; TRAIL 3 mg/kg KGW oder APG350 3 mg/kg KGW) für 5 aufeinander folgende Tage. Am ersten und letzten Behandlungstag (Tag 1 und Tag 5) wurde mittels Schwanzvenenpunktion 30 Minuten nach i.p. Applikation von PBS, TRAIL oder APG350 80 – 100 µl Blut entnommen. Es wurden zwei ELISAs zur Bestimmung der Konzentration von TRAIL (A und B) und APG350 (C und D) im Blutserum verwendet. Das Serum der PBS-Gruppe diente dabei als Kontrolle.

Zur Ermittlung des Tumorwachstums wurden auch in diesen beiden Ansätzen Ultraschall-Messungen an verschiedenen Messpunkten durchgeführt.

Die in Abbildung 3.22 dargestellten Ausschnitte von jeweils einem Mausabdomen pro Behandlungsgruppe zeigen, dass die Tumore kaudal dem Magen anliegen und dicht an die Leber angelagert sind.

Bei Betrachtung des Ansatzes mit der sensitiven Zelllinie wurde festgestellt, dass der Colo357-Vektor-Tumor in der Kontroll-Gruppe deutlich größer war als der Tumor in den beiden Behandlungsgruppen (Abbildung 3.22-A). Da die Primärtumore in der Kontroll-Gruppe am postoperativen Tag 48 einen Durchmesser von ca. 10 mm aufwiesen, wurde der Tierversuch am 50. Tag beendet.

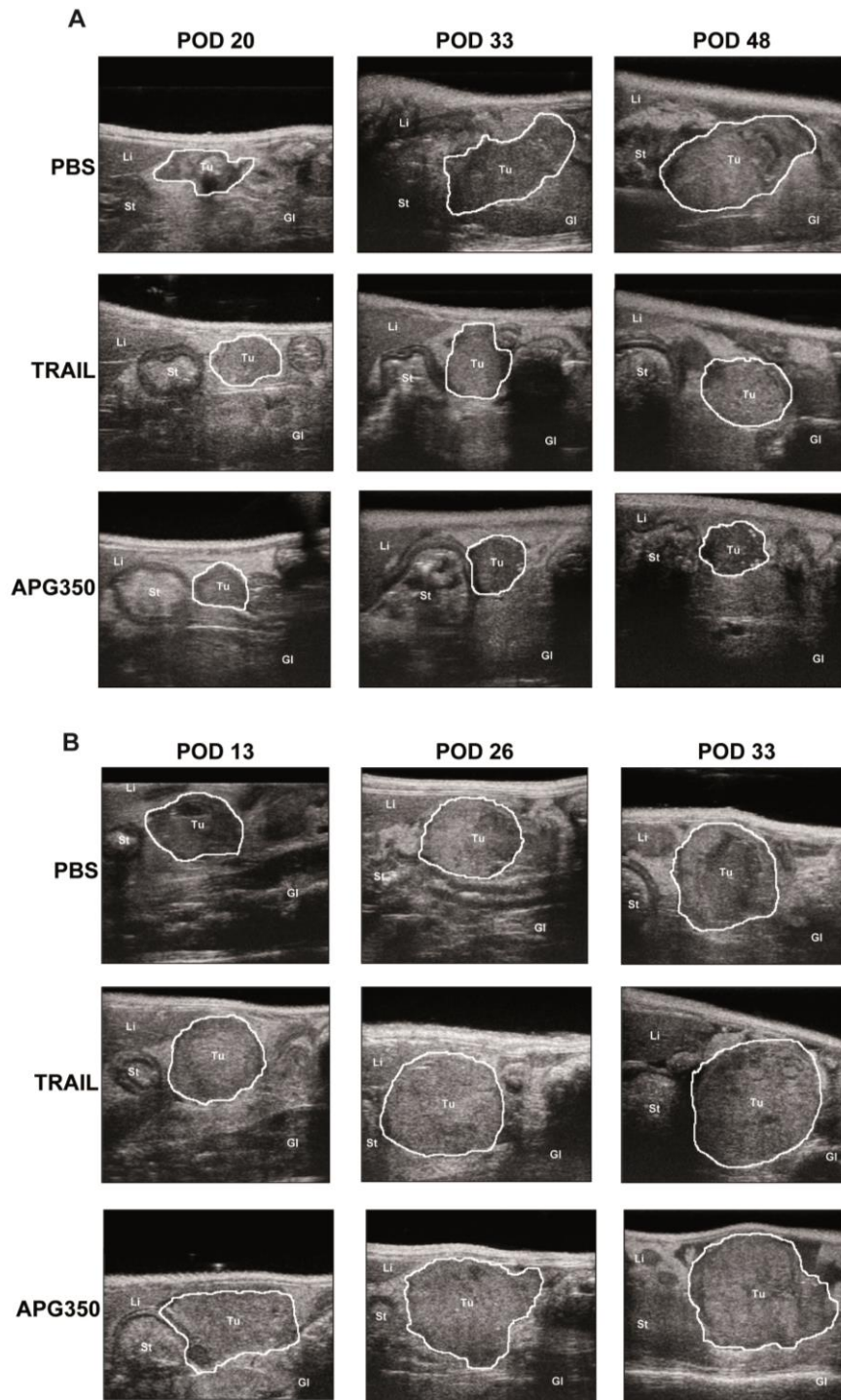


Abbildung 3.22: Repräsentative Bilder der Tumor-Sonographie des konservativen Therapieansatzes.

1×10^6 in Matrigel eingebettete Tumorzellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert. Nach 4 Tagen begann die konservative Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinanderfolgende Tage. Während des Versuchs wurden Ultraschallmessungen an den oben genannten Tagen durchgeführt. POD=postoperativer Tag. (A) Therapieansatz mit der Zelllinie Colo357-Vektor. (B) Therapieansatz mit der Zelllinie Colo357 Bcl-xL.

Im Gegensatz dazu zeigt der Versuchsansatz mit der resistenten Zelllinie, dass die Colo357 Bcl-xL-Tumore am 13. Tag deutlich größer waren. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Therapie mit APG350 bzw. mit TRAIL zu einer drastischen Erhöhung des Tumorzumens am postoperativen Tag 33 führte (Abbildung 3.22-B).

In Abbildung 3.23 ist die Auswertung der Tumorzumetrie sowie der Tumorzumichte für beide Zelllinien graphisch dargestellt.

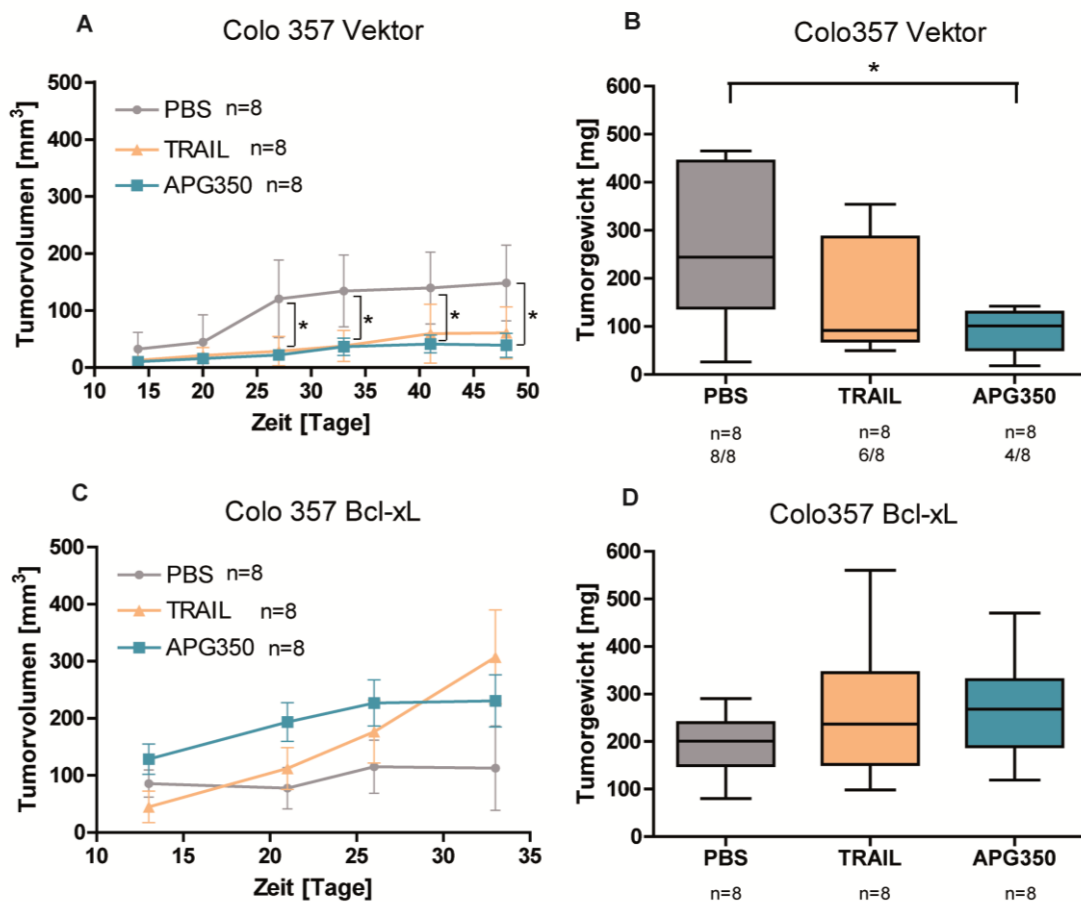


Abbildung 3.23: Einfluss der konservativen Therapie von APG350 bzw. TRAIL auf das Wachstum von sensitiven und resistenten PDAC-Tumoren.

1x10⁶ in Matrigel eingebettete Tumorzellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert. Nach 4 Tagen startete die konservative Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinander folgende Tage. (A) Tumorzumens und (B) Tumorzumicht im Versuchsansatz mit der Zelllinie Colo357-Vektor, *=p<0,05. (C) Tumorzumens und (D) Tumorzumicht im Versuchsansatz mit der Zelllinie Colo357 Bcl-xL.

Wird der Tierversuch mit den Colo357-Vektor-Zellen betrachtet, so führte die konservative APG350-Therapie zu einer signifikanten Reduzierung des Volumens der Primärtumore. Dieser Unterschied war bereits am 27. Tag zu erkennen und führte im Verlauf auch zu einer signifikant geringeren Tumormasse *post mortem* (Abbildung 3.23-A+B). In der APG350-Gruppe lag das mediane Tumorgewicht bei $101,2 \pm 53,66$ mg ($*=p>0,05$). Hingegen hatte die TRAIL-Gruppe eine Masse von $91,6 \pm 115,52$ mg und war aufgrund der großen Streuung des Medians zu den Tumoren mit PBS-Behandlung mit $244,0 \pm 175,31$ mg nicht statistisch signifikant unterschiedlich. In diesem Versuchsansatz führte die Behandlung zu einer Eliminierung des Primarius. Während alle Tiere in der PBS-Gruppe einen Tumor besaßen (8 von 8), wurde lediglich bei 75 % der Mäuse unter TRAIL-Therapie (6 von 8) und bei 50 % der Mäuse unter APG350-Therapie (4 von 8) ein Tumor identifiziert (Abbildung 3.23-A).

Demgegenüber besaßen im Versuchsansatz mit den resistenten Zellen alle Mäuse in allen Gruppen einen Primärtumor. Die konservative Therapie zeigt, dass weder die Behandlung mit APG350 noch die Behandlung mit TRAIL einen therapeutischen Effekt auf das Volumen der Colo357-Bcl-xL-Tumore hatte (Abbildung 3.23-C). Ferner scheinen beide Substanzen das Wachstum des Primarius zu stimulieren, da das Tumorgewicht der APG350-Gruppe mit $268 \pm 114,45$ mg und in der TRAIL-Gruppe mit $236,5 \pm 152,68$ mg größer war als das Tumorgewicht in der PBS-Gruppe mit $201 \pm 67,04$ mg (Abbildung 3.23-D).

Um zu überprüfen, ob die Colo357 Bcl-xL-Tumore tatsächlich die Überexpression von Bcl-xL unter den *in vivo* Bedingungen aufwiesen, wurden sowohl von den PBS-behandelten Colo357-Vektor-Tumoren als auch von den PBS-behandelten Colo357 Bcl-xL-Tumoren Gesamtproteinextrakte hergestellt und die Expression von Bcl-xL im Western Blot analysiert. Der Western Blot Nachweis zeigt, dass der Antikörper eine bei 27 kDa große Bande detektierte, was der Größe des Bcl-x Proteins entspricht. Die Bcl-xL-Expression war bei den Bcl-xL-überexprimierten Colo357-Tumoren deutlich stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden Colo357-Vektor-Kontrolltumoren (Abbildung 3.24).

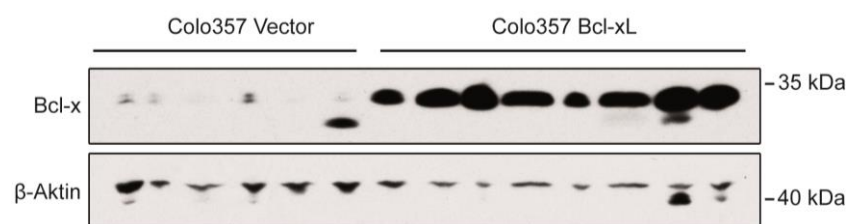


Abbildung 3.24: Bcl-xL-Expression in Colo357-Vektor- und Colo357 Bcl-xL-Tumoren.

Die Expression des Bcl-xL Proteins in Colo357-Vektor- und Colo357 Bcl-xL-Tumore wurde mittels Western Blot Methode analysiert. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Um die Proliferationsrate der Tumore zu beurteilen, wurde das Tumorgewebe immunhistochemisch Ki67 gefärbt und prozentual die Ki67-gefärbten Zellen bestimmt. Da in dem Versuchsansatz mit den Colo357-Vektor-Tumoren lediglich 75 % der Tiere in der TRAIL-Gruppe und 50 % der Tiere in der APG350-Gruppe einen Primärtumor besaßen und diese sehr klein waren, konnten 4 Tumore in der TRAIL-Gruppe und 1 Tumor in der APG350-Gruppe für die immunhistochemische Färbung verwendet werden.

Die Abbildung 3.25 zeigt repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Ki67 an behandelten Primärtumoren (Abbildung 3.25-A+D). Während in dem PBS-behandelten Tumor zahlreiche Zellen Ki67 positiv waren, wurden weniger positive Zellen in dem TRAIL-behandelten sowie in dem APG350-behandelten Tumor beobachtet. Die Auswertung der Ki67-positiv gefärbten Zellen zeigt, dass die TRAIL- bzw. APG350-behandelten Tumore mit geringer Masse deutlich weniger Ki67 positive Zellen aufwiesen (Abbildung 3.25-B-C).

Bei Betrachtung des konservativen Versuchsansatzes mit den Colo357 Bcl-xL-Tumoren zeigt sich, dass es keine Veränderung in der Ki67-Proliferationsrate zwischen den Behandlungsgruppen gab (Abbildung 3.25-E-F).

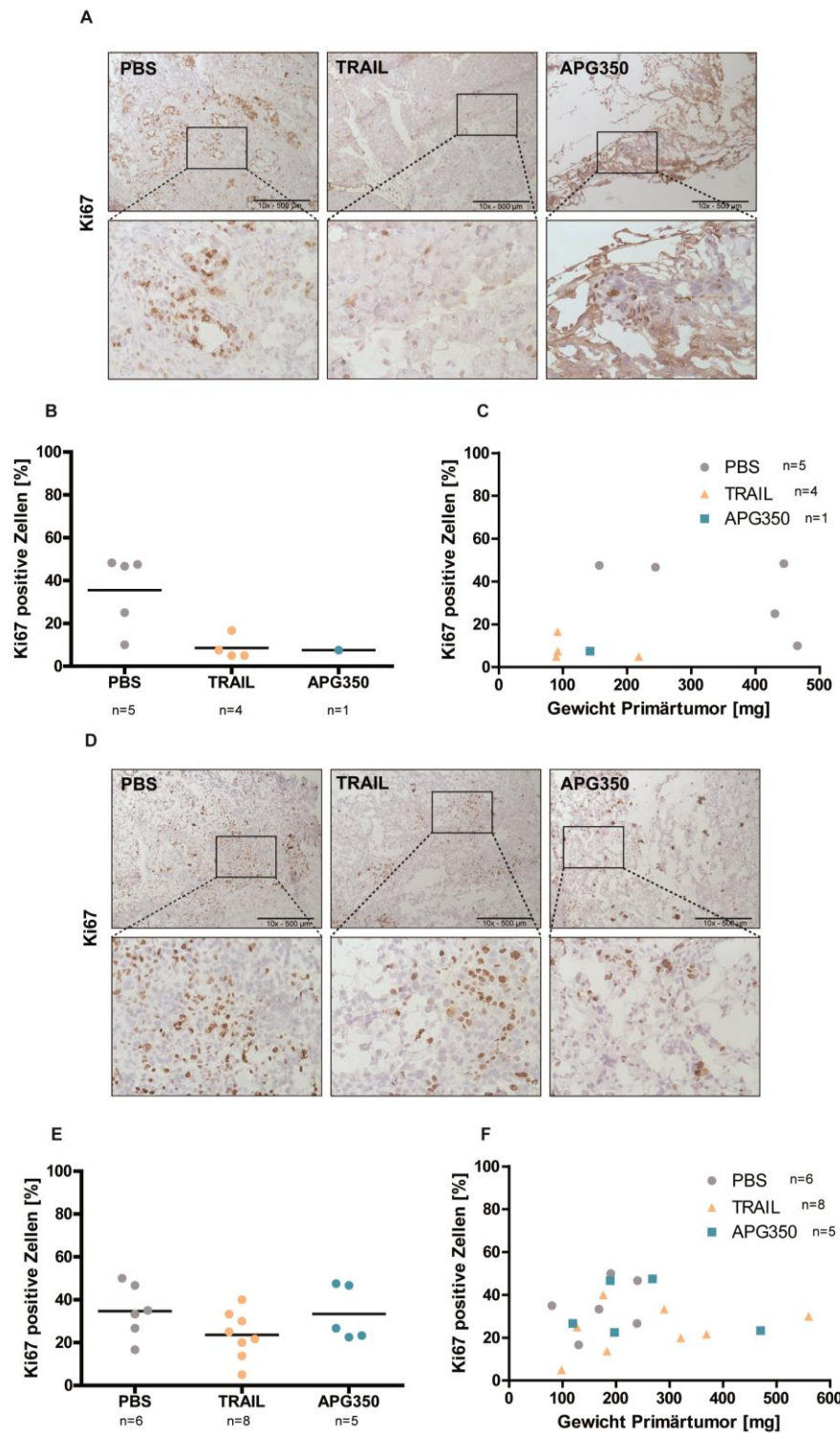


Abbildung 3.25: Einfluss der konservativen Therapie von TRAIL bzw. APG350 auf die Proliferation.

2 µm Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Tumorschnitte wurden mit Antikörper gegen Ki67gefärbt. (A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen von Ki67 an Colo357-Vektor-Tumoren. (B) Auswertung der Ki67-positiven Zellen. (C) Korrelation zwischen Tumorgewicht und der Proliferationsrate. (D) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen von Ki67 an Colo357 Bcl-xL-Tumoren. (E) Auswertung der Ki67-positiven Zellen. (F) Korrelation zwischen Tumorgewicht und der Proliferationsrate. Skala: Die schwarzen Balken entsprechen 500 µm.

3.2.1.3 Einfluss der konservativen APG350-Therapie auf die Metastasierung

Um die Ausprägung von Fernmetastasen näher zu untersuchen, wurde am Ende der jeweiligen Versuche die Leber makroskopisch auf das Vorhandensein von Metastasen inspiziert.

In dem Versuchsansatz mit der Zelllinie PancTul konnte gezeigt werden, dass 43 % der PBS-behandelten Tiere (4 von 7) makroskopisch Lebermetastasen entwickelten. Von den 4 Mäusen besaßen zwei Mäuse eine Metastase und eine Maus hatte 2 sichtbare Lebermetastasen. Die TRAIL-behandelten Mäuse hatte mit 14 % eine deutlich geringere Lebermetastasen-Rate (1 von 7). In der APG350-behandelten Gruppe waren 37,5 % der Mäuse (3 von 8) makroskopisch mit jeweils 2 Lebermetastasen befallen (Abbildung 3.26-A).

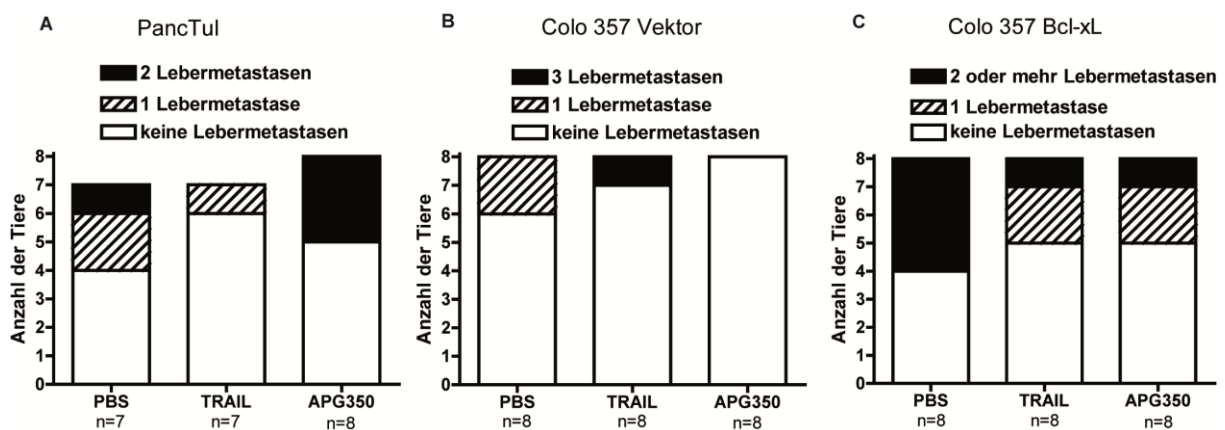


Abbildung 3.26: Wirkung der konservativen TRAIL- bzw. APG350-Therapie auf die Lebermetastasierung.

1×10^6 in Matrigel eingebettete Tumorzellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert. Nach 4 Tagen startete die konservative Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinanderfolgende Tage. Am Ende jeden Versuchs wurden die Mäuse auf makroskopisch sichtbare Lebermetastasen untersucht. Versuchsansatz mit der Zelllinie (A) PancTul, (B) Colo357-Vektor und (C) Colo357 Bcl-xL.

Bei der Auswertung des Ansatzes mit der sensitiven Zelllinie Colo357-Vektor wird deutlich, dass die konservative APG350-Therapie zu keinen sichtbaren Lebermetastasen führte. In der PBS-Gruppe waren 25 % der Tiere von jeweils 1 Metastase (2 von 8) befallen und lediglich eine Maus (12,5 %) entwickelte unter der konservativen TRAIL-Therapie Lebermetastasen mit einer Anzahl von 3 (Abbildung 3.26-B).

Der Versuchsansatz mit der resistenten Colo357 Bcl-xL-Zelllinie zeigte ein anderes Metastasierungsmuster. In der PBS-Gruppe wiesen 50 % der Tiere (4 von 8)

Lebermetastasen auf. Dahingegen war die Anzahl der Tiere mit Lebermetastasen unter der konservativen Therapie mit TRAIL bzw. APG350 identisch, lediglich 3 von 8 Tiere (37,5 %) hatten makroskopisch erkennbare Lebermetastasen (Abbildung 3.26-C).

3.2.2 Einfluss der adjuvanten APG350-Therapie auf PDAC-Rezidive und Metastasierung

Da 80 % der Patienten mit einem Pankreaskarzinom nach erfolgter R0-Resektion eine Rezidivkrankung entwickeln, wurde das primäre Tumormodell um eine Tumorsektion in Form einer Pankreasschwanzresektion erweitert. Somit konnte die pharmakologische Wirkung von APG350 auf die Ausprägung eines Rezidivtumors und die Fernmetastasen untersucht werden.

Es wurden, gleichbleibend wie im konservativen Ansatz, die drei Zelllinien PancTul, Colo357-Vektor und Colo357-Bcl-xL für das Resektionsmodell verwendet. 1 Millionen Tumorzellen wurden orthotop in den Pankreas von SCID beige Mäusen inokuliert. Anschließend wurde der entstandene Primärtumor nach 14 Tagen mittels subtotaler Pankreatektomie entfernt. Vier Tage nach diesem Eingriff wurden die Mäuse randomisiert und die adjuvante Therapie mit PBS, TRAIL (3 mg/kg KGW) oder APG350 (3 mg/kg KGW) einmal täglich i.p. für fünf aufeinanderfolgende Tage durchgeführt.

3.2.2.1 APG350 reduziert das Gewicht der PDAC-Rezidivtumore

Der Versuchsansatz mit der Zelllinie PancTul ist graphisch in Abbildung 3.33 dargestellt. Zu Beginn waren 33 Mäuse im Versuch. Sowohl bei der ersten Operation (Tumorzellinokulation) als auch bei der zweiten Operation (Tumorsektion) verstarben jeweils 6 Tiere, sodass die adjuvante Therapie mit 7 Mäusen pro Gruppe durchgeführt werden konnte. Der Tierversuch hatte eine Dauer von 36 Tagen (Abbildung 3.27).

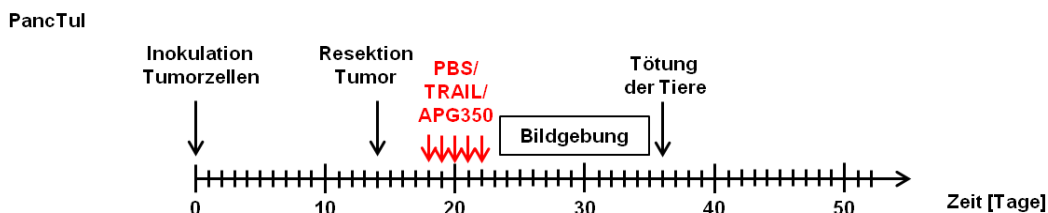


Abbildung 3.27: Übersicht des Tierversuchs mit der Zelllinie PancTul in der adjuvanten Therapie.

Bei der Resektion des Primärtumors konnte festgestellt werden, dass jede Maus einen Primärtumor entwickelt hat. Das mediane Gewicht dieser betrug $60 \text{ mg} \pm 22,01 \text{ mg}$. Nach diesem operativen Eingriff begann die adjuvante Therapie mit APG350 bzw. TRAIL vier Tage später mit einer gesamten Dauer von fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Da die Rezidivtumore im Kleintierultraschall im Verlauf des Versuches schwer zu erkennen waren, wurde am letzten Tag ein Ganzkörper-MRT an zwei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Der MRT-Scan zeigt, dass der Rezidivtumor in der Kontroll-Gruppe (PBS-Behandlung) größer war als derer in der APG350-Gruppe und in der TRAIL-Gruppe (Abbildung 8.2-A im Anhang). Einen Tag später wurde der Versuch beendet und die Masse der Rezidivtumore bei allen Mäusen *post mortem* ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Tiere, unabhängig von der Behandlung, einen Rezidivtumor besaßen. In der PBS-Gruppe lag das mediane Gewicht des Rezidivtumors bei $560 \pm 305,45 \text{ mg}$ (Abbildung 3.28). Im Vergleich dazu war der Rezidivtumor in der TRAIL-Gruppe mit $181 \pm 201,11 \text{ mg}$ signifikant kleiner ($*=p<0,05$). Außerdem konnte eine signifikante Reduktion des Rezidivs unter adjuvanter Therapie mit APG350 erzielt werden. Das Tumorgewicht lag in dieser Behandlungsgruppe bei $146 \pm 290,14 \text{ mg}$ ($*=p<0,05$).

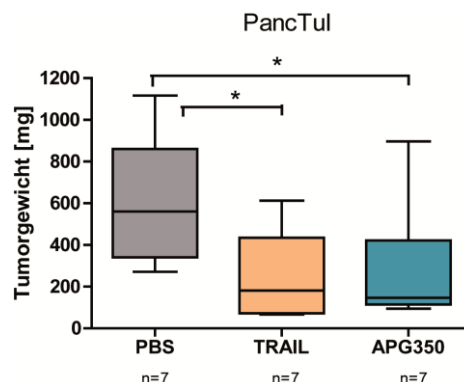


Abbildung 3.28: Adjuvante Therapie mit TRAIL oder APG350 reduziert signifikant das Gewicht der PancTul-Rezidivtumore.

1×10^6 in Matrigel eingebettete PancTul-Zellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert. Nach der Entstehung eines soliden Tumors wurde dieser am 14. Tag mittels subtotaler Pankreasresektion entfernt. Vier Tage später erfolgte die adjuvante Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinanderfolgende Tage. Am 33. Tag wurde der Versuch beendet und das Gewicht der Rezidivtumore bestimmt. $*=p<0,05$.

Um die Proliferationsrate der behandelten Rezidivtumore pathophysiologisch näher zu bestimmen, wurde auch in diesem Therapieansatz immunhistochemisch eine Ki67-Färbung an Rezidivtumoren durchgeführt. Es konnten jeweils 6 Rezidivtumore pro Gruppe gefärbt und ausgewertet werden.

Die Abbildung 3.29 verdeutlicht, dass die adjuvante Therapie mit TRAIL bzw. APG350 zu keiner Veränderung in der Ki67-Rate führte (Abbildung 3.29).

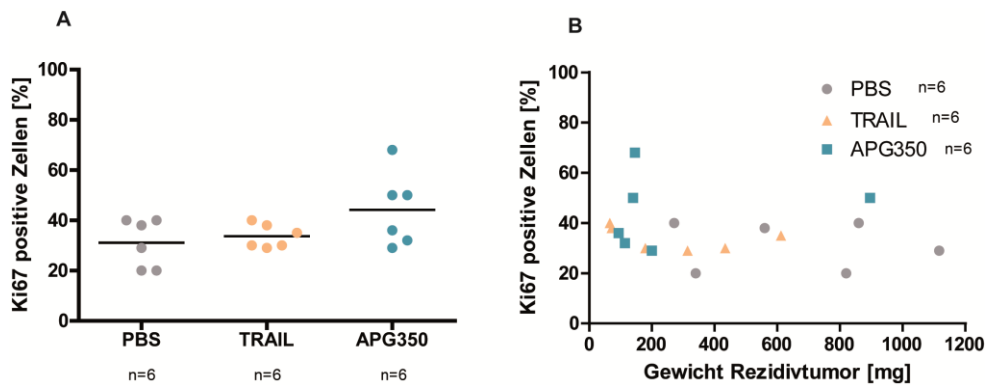


Abbildung 3.29: Adjuvante Therapie führt zu keiner Veränderung der Proliferationsrate Ki67 in PancTul-Rezidivtumoren.

2 µm Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Tumorschnitte wurden mit Antikörper gegen Ki67gefärbt. (A) Auswertung der Ki67-positiven Tumore. (B) Korrelation zwischen Tumorgewicht und der Proliferationsrate.

3.2.2.2 Expression von TRAIL-R 1 und TRAIL-R 2 in PDAC-Tumoren

Um die Expression der Todesrezeptoren im Tumorgewebe nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern für TRAIL-Rezeptor 1 und TRAIL-Rezeptor 2 an Paraffingewebe durchgeführt.

Die Abbildung 3.30 zeigt, dass die beiden TRAIL-Rezeptoren verstärkt in den Rezidivtumoren im Gegensatz zu den Primärtumoren exprimiert waren (Abbildung 3.30).

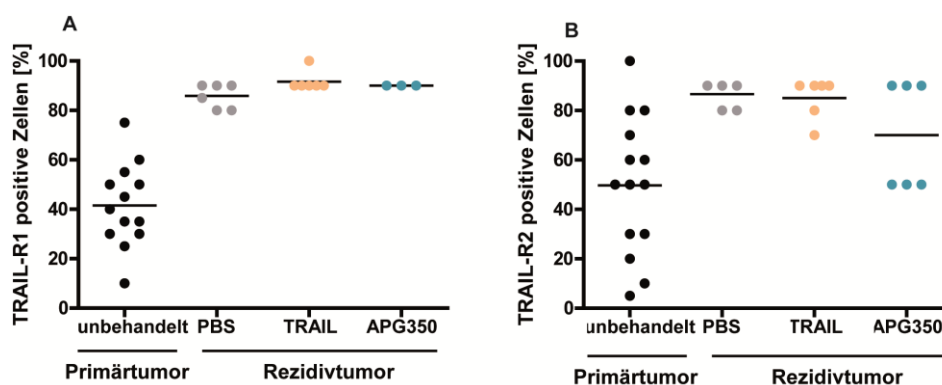


Abbildung 3.30: TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 positive Zellen in PancTul-Tumoren.

Unbehandelte Tumore wurden am 14. postoperativen- und behandelte Tumore am 33. postoperativen Versuchstag asserviert. 2 µm Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Tumorschnitte wurden mit Antikörper gegen (A) TRAIL-R1 und (B) TRAIL-R2 gefärbt.

Um die humanen PancTul-Tumorzellen im Gewebe zu charakterisieren wurde nachfolgend eine KL-1-Färbung durchgeführt. KL-1 ist ein Panzytokeratin und dient als Marker für die Differenzierung von Karzinomen. Die in Abbildung 3.32 dargestellte KL-1-Expression zeigt eine ausgeprägte epitheliale Histogenese der Tumore. Es ist bekannt, dass der nukleäre TRAIL-Rezeptor 2 mit einer erhöhten Expression von HMGA2 in Tumorzellen korreliert (Haselmann et al., 2014). Daher wurde im Folgenden die HMGA2-Expression in den PancTul-Rezidivtumoren mittels Immunhistochemie analysiert.

Die Expression von HMGA2 war in allen behandelten Tumoren ähnlich stark verteilt. Der CD31-Nachweis verdeutlicht, dass die Behandlung zu keiner Veränderung der Tumurvaskularisierung führte (Abbildung 3.31).

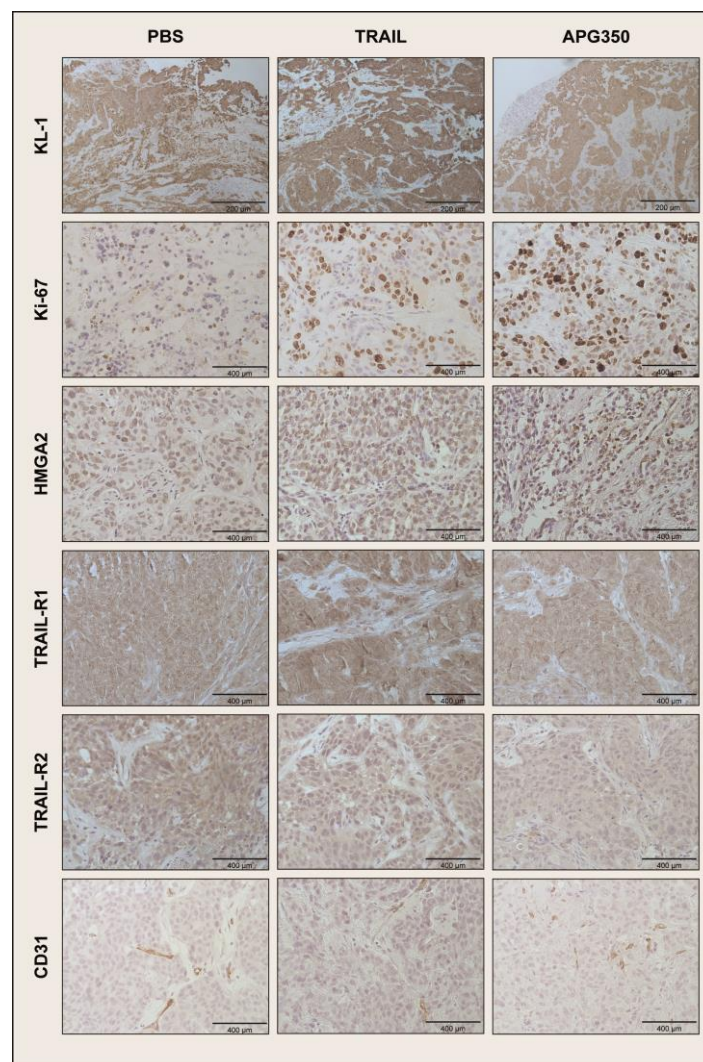


Abbildung 3.31: Immunhistochemische Färbungen an behandelten PancTul-Rezidivtumoren.

2 µm Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Tumorschnitte wurden mit Antikörper gegen KL-1, Ki67, HMGA2, TRAIL-R1, TRAIL-R2 sowie CD31 gefärbt. Skala: Die schwarzen Balken entsprechen 200 (KL-1) bzw. 400 µm (alle anderen Nachweise).

3.2.2.3 Überexpression von Bcl-xL führt nicht zur APG350-vermittelten Apoptose in PDAC-Rezidiven

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-xL in Colo357-Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose schützt. Da die therapeutische Wirkung von APG350 und TRAIL auf resistente Rezidive *in vivo* bisher nicht bekannt ist wurde im Folgenden dieser Aspekt mittels Resektionsversuch mit den beiden Zelllinien Colo357-Vektor und Colo357 Bcl-xL vergleichend untersucht.

Für den Versuchsansatz mit den Colo357-Vektor-Zellen standen zu Beginn 40 Tiere zur Verfügung. Während der ersten Operation (Tumorzellinokulation) wurde kein Verlust an Tieren verzeichnet. Bei der zweiten Operation (Tumorresektion) sind 9 Tiere verstorben und ein weiteres Tier war nach der Substanzapplikation unerwartet verstorben. Demzufolge wurde dieser Versuch mit einer Anzahl von 30 Tieren (n=10 pro Gruppe) am Tag 52 beendet (Abbildung 3.32). Wird der Ansatz mit den Colo357 Bcl-xL-Zellen betrachtet, so waren ebenfalls 40 Mäuse zu Beginn im Versuch. Zwei Tiere verstarben während der Tumorzellinokulation und fünf weitere Tiere verstarben während der Tumorresektion. Somit konnte die adjuvante Therapie mit 33 Mäusen (n=11 pro Gruppe) durchgeführt werden. Dieser Versuchsansatz hatte eine Dauer von 49 Tagen (Abbildung 3.32).

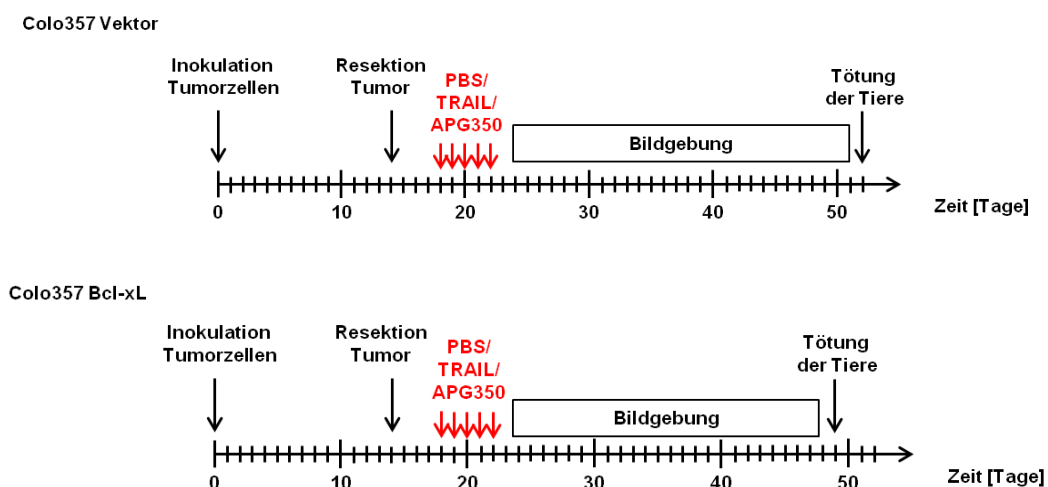


Abbildung 3.32: Übersicht der Tierversuche mit den Zelllinien Colo357-Vektor und Colo357 Bcl-xL in der adjuvanten Therapie.

Der Versuch mit den sensitiven Colo357-Vektor-Zellen zeigt, dass alle Mäuse einen Primärtumor nach 14 Tagen besaßen. Das mediane Tumorgewicht betrug $33 \pm 26,65$ mg. Bei Betrachtung der Rezidivtumore wurde deutlich, dass 5 der 10 Tiere in der PBS-Gruppe einen Tumor entwickelten (50 %). Das mediane Tumorgewicht betrug in dieser Gruppe $27 \pm 84,99$ mg. Dahingegen führte die adjuvante Therapie mit TRAIL bzw. APG350 zur

verminderten Ausprägung von Rezidiven. In der TRAIL-Gruppe hatten 4 der 10 Tiere einen Rezidivtumor (40 %). Das mittlere Tumorgewicht betrug $6,50 \pm 2,87$ mg. In der APG350-Gruppe entwickelten lediglich 2 Mäuse einen Tumor (20 %) mit einem medianen Gewicht von $2,50 \pm 0,71$ mg (Abbildung 3.33-A).

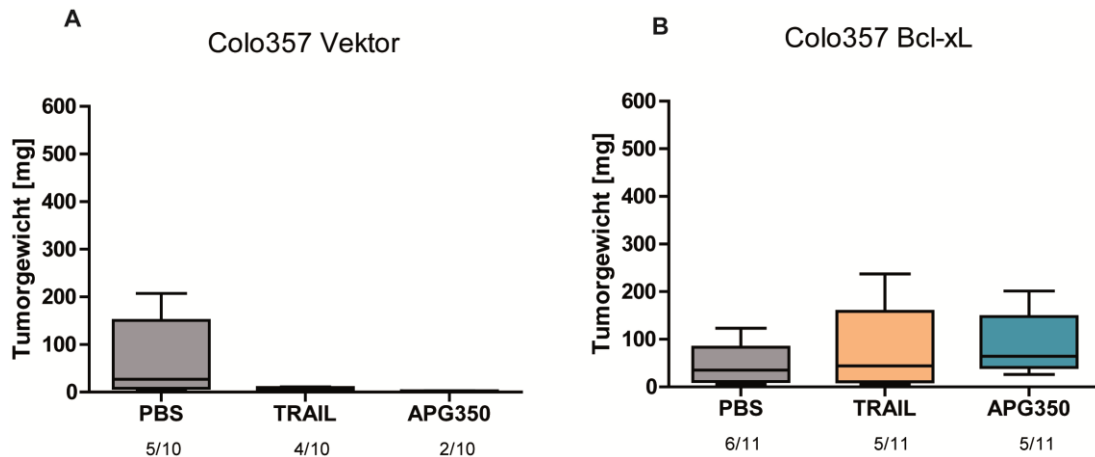


Abbildung 3.33: Wirkung der adjuvanten Therapie mit TRAIL bzw. APG350 auf sensitive und resistente PDAC-Tumore.

1×10^6 in Matrigel eingebettete Colo357-Vektor- bzw. Colo357 Bcl-xL-Zellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert. Nach der Entstehung eines soliden Tumors wurde dieser am 14. Tag mittels subtotaler Pankreasresektion entfernt. Vier Tage später erfolgte die adjuvante Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinanderfolgende Tage. (A) Am 52. Tag bzw. (B) am 49. Tag wurde der Versuch beendet und das Gewicht der Rezidivtumore bestimmt.

Wird der Versuch mit der resistenten Zelllinie Colo357 Bcl-xL betrachtet, konnte festgestellt werden, dass bei allen Tieren ein Primärtumor entstand und diese eine mediane Masse von $79 \pm 44,41$ mg besaß. Nach einer Versuchsdauer von 49 Tagen konnte beobachtet werden, dass 6 der 11 Mäuse (55 %) in der PBS-Gruppe einen Rezidivtumor entwickelten. Das mediane Tumorgewicht betrug in dieser Gruppe $35,00 \pm 41,71$ mg. In beiden Behandlungsgruppen hatten 5 der 11 Tiere (45 %) einen Rezidivtumor. In der TRAIL-Gruppe betrug das Tumorgewicht $44,00 \pm 94,34$ mg und in der APG350-Gruppe lag das Gewicht der Rezidivtumore bei $64,00 \pm 67,66$ mg. Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen verzeichnet werden (Abbildung 3.33-B).

Wie bereits im konservativen Versuchsansatz geschehen, wurde auch hier die Bcl-xL Expression in den Primär- und Rezidivtumoren an kryokonserviertem Material mittels Western Blot Analyse untersucht. Sowohl die Colo357 Bcl-xL-Primärtumore als auch die Colo357-Rezidivtumore wiesen ein erhöhtes Level des Bcl-xL-Proteins auf (Abbildung 3.34).

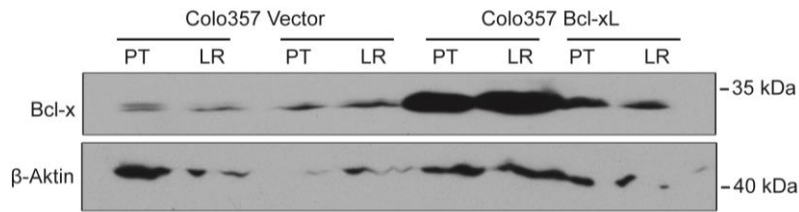


Abbildung 3.34: Expression von Bcl-xL in sensitiven und resistenten PDAC-Tumoren.

Das Tumormaterial wurde nach der Entnahme kryokonserviert und anschließend Proteine isoliert. Die Expression des Proteins Bcl-xL wurde mittels Western Blot Technik analysiert. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. PT = Primärtumor, LR = Lokalrezidiv.

3.2.2.4 Adjuvante APG350-Therapie reduziert signifikant die Lebermetastasen

Im Folgenden wurde das Metastasierungsmuster der Tumorzellen näher untersucht, um zu überprüfen, ob der zweite operative Eingriff einen Einfluss auf die Metastasierung ausübt und inwiefern diese durch die adjuvante Therapie mit TRAIL oder APG350 verändert wird.

Um die Ausbreitung von Fernmetastasen zu untersuchen wurden MRT-Messungen an narkotisierten Tieren einen Tag vor Versuchsende durchgeführt. Da der Ganzkörper-Scan pro Maus 40-50 min dauerte wurden pro Gruppe jeweils zwei Mäuse im MRT auf das Vorhandensein von Lebermetastasen untersucht. Jeweils eine Maus in jeder Behandlungsgruppe hatte makroskopisch sichtbare Metastasen in der Leber (Abbildung 8.2-B im Anhang). Einen Tag später wurde der Versuch beendet und alle Mäuse *post mortem* auf entstandene Lebermetastasen untersucht. Dabei zeigt sich, dass 85,7 % der Tiere (6 von 7) in der PBS-Gruppe Lebermetastasen mit einer Anzahl von 24 makroskopisch sichtbaren Metastasen besaßen. Hingegen waren in der TRAIL-Gruppe 71,4 % Mäuse (5 von 7) mit makroskopisch erkennbaren Metastasen befallen. Davon hatten 4 Mäuse eine Lebermetastase und ein Tier mehr als 2 Metastasen. Die adjuvante APG350-Therapie reduziert signifikant die Anzahl der Lebermetastasen im Vergleich zur Kontrolle (PBS-behandelte Tiere, $*=p<0,05$). Dabei trugen lediglich 28,6 % der Mäuse (2 von 7) makroskopisch sichtbare Lebermetastasen in der APG350-Gruppe (Abbildung 3.35-A).

Wird der Ansatz mit der sensitiven Zelllinie Colo357-Vektor betrachtet, so wird sichtbar, dass die TRAIL-behandelten Tiere keine makroskopisch erkennbaren Lebermetastasen aufwiesen. In der APG350-behandelten Gruppe hatten 10 % der Mäuse (1 von 10) Lebermetastasen. Dagegen entwickelten in der PBS-behandelten Gruppen 10 % der Tiere (1 von 10) Metastasen mit einer Anzahl von 5 (Abbildung 3.35-B).

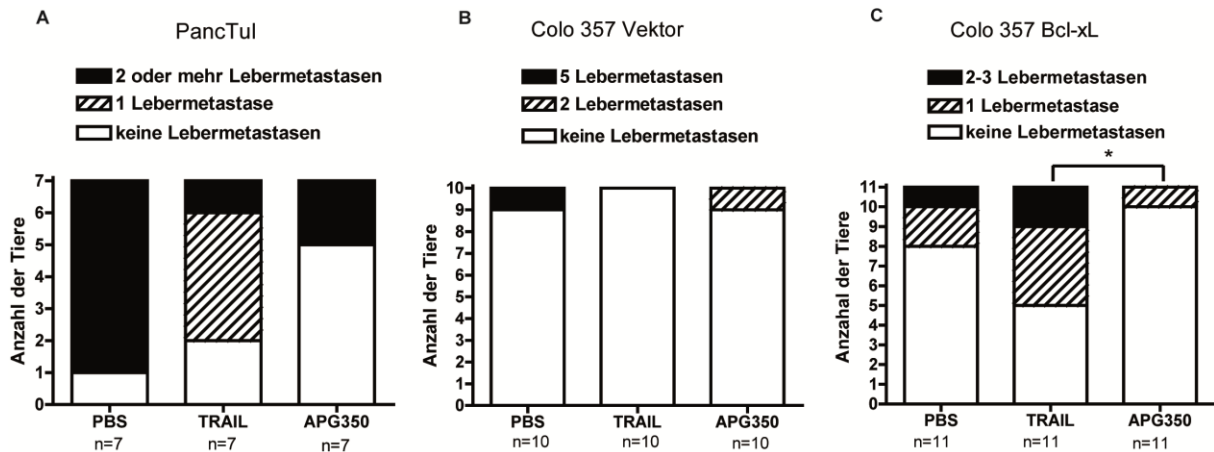


Abbildung 3.35: Wirkung der adjuvanten TRAIL- bzw. APG350-Therapie auf die Lebermetastasierung.

1×10^6 in Matrigel eingebettete PancTul-Zellen wurden orthotop in den Mauspankreas inokuliert, und ein Primärtumor regeneriert. Nach der Entstehung eines soliden Tumors wurde dieser am 14. Tag mittels subtotaler Pankreasresektion entfernt. Vier Tage später erfolgte die adjuvante Therapie mit PBS, TRAIL oder APG350 (i.p. 3 mg/ kg KGW) für fünf aufeinanderfolgende Tage. Am Ende jeden Versuchs wurden die Tiere auf makroskopisch sichtbare Lebermetastasen untersucht. Versuchsansatz mit der Zelllinie (A) PancTul, (B) Colo357-Vektor und (C) Colo357 Bcl-xL.

Der durchgeführte Versuchsansatz mit der resistenten Zelllinie Colo357 Bcl-xL zeigt, dass die adjuvante APG350-Therapie zu einer signifikant verringerten Lebermetastasierung führte. Lediglich 9,1 % der Tiere (1 von 11) in der APG350-Gruppe zeigten Metastasen in der Leber. Demgegenüber entwickelten in der TRAIL-Gruppe 55 % der Mäuse (5 von 11) makroskopisch sichtbare Lebermetastasen. In der PBS-Gruppe besaßen 27 % der Tiere (3 von 11) Metastasen (Abbildung 3.35-C).

4. Diskussion

Der Ligand TRAIL kann nach der Bindung an seine Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Apoptose auslösen. Besonderes Interesse erlangte rekombinantes TRAIL darin, dass die systemische Behandlung Zelltod spezifisch in Tumorzellen induzierte, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen (Walczak et al., 1999). Die Tatsache, dass Tumorzellen eine hohe Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 aufweisen, führte zur Entwicklung von einer Vielzahl an TRAIL-basierten Tumorthérapien (Walczak et al., 1997; Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999; Kelley et al., 2001; Sträter et al., 2002; Spierings et al., 2003). So erlangten rekombinantes TRAIL und agonistische anti-TRAIL-R1 und anti-TRAIL-R2 spezifische Antikörper zunächst großes Interesse und wurden in klinischen Studien der Phasen-I und -II als Mono- und Kombinationstherapien erprobt (Micheau et al., 2013; Lemke et al., 2014). Jedoch blieb der erhoffte Erfolg bislang aus. Dies liegt begründet darin, dass die Mehrzahl der Tumorzellen intrinsisch TRAIL-resistent ist oder während der TRAIL-Therapie aufgrund der Selektion resistenter Zellen die Apoptoseresistenz entwickelt (Herbst et al., 2010; Soria et al., 2010). Darüber hinaus sind die TRAIL-Rezeptoren in der Lage verschiedene nicht-apoptotische Signalwege mit einhergehender Steigerung der Inflammation, Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierung zu induzieren (Trauzold et al., 2006; Hoogwater et al., 2010; Aziji et al., 2013). Unlängst haben zwei Studien zeigen können, dass das misslungene Ansprechen der Tumorzellen auf die Therapie auch mit der geringeren Stabilität und Löslichkeit von rekombinanten TRAIL sowie von TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-spezifischen agonistischen Antikörpern begründet ist und in Folge dessen deren Bioverfügbarkeit beeinflusst wird (Graves et al., 2014; Tuthill et al., 2015). Dies führte zur Entwicklung von neuen Formen von rekombinanten TRAIL und somit zu einer neuen Generation der TRAIL-basierten Tumorthérapie (Holland, 2014; Miguel et al., 2016).

Ein solches neues TRAIL-Konstrukt ist das APG350, was von dem biopharmazeutischen Unternehmen Apogenix (Heidelberg) entwickelt wurde und für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit in unbegrenzter Menge zur Verfügung stand. Dieser TRAIL-Rezeptor-Agonist besteht aus zwei trimeren TRAIL-Molekülen, die in der Lage sind, im Vergleich zu trimeren TRAIL, an sechs und demnach doppelt so vielen TRAIL-Rezeptoren zu binden. Bereits in einer Studie von Kim *et al.* wurde die verbesserte Induktion des apoptotischen Signalweges in NSCLC-Tumorzellen durch hexameres TRAIL im Vergleich zu trimeren TRAIL beschrieben (Kim et al., 2004). Die Entwicklung von neuen rekombinanten TRAIL-Formen und somit auch vom APG350 beruht darauf, dass die TRAIL-Trimere durch ein internes Zink-Atom stabilisiert vorliegen, da das Zink-Atom mit den drei Cystein-Resten der Monomere eine nicht-kovalente Bindung eingeht und diese Interaktion eine große Bedeutung

für die Stabilität, Löslichkeit und Bioaktivität von rekombinanten TRAIL darstellt (Cha et al., 1999; Hymowitz et al., 1999; Lawrence et al., 2001). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete hexamere APG350 hat eine weitere Besonderheit. Die beiden verknüpften trimeren TRAIL-Moleküle sind kovalent mit einem modifizierten Fc-Teil eines IgG1-Antikörpers gekoppelt (Fc-TRAIL), was zum einen der Stabilität des Konstruktes dient und zum anderen zu einer verbesserten biologischen Aktivität führen soll. Wang *et al.* konnte in einer Studie an NSCLC-Karzinomzellen zeigen, dass das Fc-TRAIL eine 30 % stärkere Apoptoseinduktion im Vergleich zu rekombinanten TRAIL ohne Fc-Teil bewirkte (Wang et al., 2014). Gleichwohl bedeutsam konnte gezeigt werden, dass die für die Herstellung vom löslichen rekombinanten TRAIL wichtige Aufreinigungsprozedur ein wichtiger Aspekt für seine biologische Wirkung darstellt. So führt die Aufreinigung von TRAIL mit Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung (Phosphatpuffer mit der Reagenz β -Mercaptoethanol im Vergleich zu der Reagenz Dithiothreitol) zu einer veränderten Oligomerisierung der TRAIL-Moleküle und folglich zu einer veränderten apoptotischen Wirkung von TRAIL (Kim et al., 2004). Weiterhin zeigt das hexamere APG350, ebenso für das trimere TRAIL bekannt, in toxikologischen Untersuchungen an Mäusen und Javaneraffen eine gute Verträglichkeit *in vivo* ohne Beeinträchtigung von gesunden transformierten Zellen (Gieffers et al., 2013).

Die oben genannten Eigenschaften macht das APG350 einzigartig auf dem Gebiet der neu entwickelten Formen von rekombinanten TRAIL. Da die Wirkung von APG350 für das Pankreaskarzinom bisher nicht bekannt ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die pharmakologische Wirkung des neuen TRAIL-Rezeptor-Agonisten auf Pankreastumorzellen *in vitro* und *in vivo* zu testen.

Als Vergleichssubstanz für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten APG350-Untersuchungen diene eine kommerziell erhältliche lösliche rekombinante TRAIL-Variante (PeproTech, Hamburg). Es wurde gezielt eine TRAIL-Variante ohne die zuvor häufig genutzten His- bzw. FLAG-verknüpften Varianten verwendet, da die letztgenannten TRAIL-Formen zwar die Apoptose stark *in vitro* induzierten, aber *in vivo* unerwünschte toxische Nebenwirkungen wie die Schädigung von gesunden Leberzellen aufzeigten (Ashkenazi et al., 1999; Kelley et al., 2001, Lawrence et al., 2001; Koschny et al., 2007). Wird der klinische Aspekt betrachtet, so wurde aus dem oben genannten Grund eine unmarkierte Form von TRAIL, mit dem Namen Dulanermin, für die klinischen Experimente verwendet (Lemke et al., 2014).

Für die *in vitro*-Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich von APG350 und TRAIL sowohl nach der massenbezogenen Konzentration als auch nach der stoffmengenbezogenen Konzentration durchgeführt, da beide Substanzen sich hinsichtlich ihrer atomaren Masse und demnach in der Molekülgröße unterscheiden. Das trimere TRAIL hat mit einem Molekulargewicht von 58,8 kDa eine 2,8-fach geringere atomare Masse als das hexamere APG350 mit einem Molekulargewicht von 170 kDa (Ashkenazi et al., 1999; Gieffers et al., 2013).

Das Resultat der Zelltod-Untersuchungen nach der massenbezogenen Konzentration zeigt, dass trimeres TRAIL in den Apoptose-sensitiven Zellen Colo357 und Panc89 signifikant mehr Zelltod induzierte als hexameres APG350. Das könnte daran liegen, dass bei APG350 aufgrund der größeren Masse weniger TRAIL-Moleküle vorhanden sind als bei TRAIL.

Um die Effektivität der apoptotischen Signaltransduktion durch APG350 näher zu untersuchen, wurden die PDAC-Zelllinien mit zwei weiteren TRAIL-Rezeptor-Agonisten (APG780 und APG861) behandelt und die Wirkung deren mit der Wirkung von APG350 bei identischer massenbezogener Konzentration verglichen. Alle drei Konstrukte vereinen, dass sie aus zwei trimeren TRAIL-Molekülen bestehen. Dennoch sind das APG780 und das APG861 mit jeweils einem anderen Dimerisierungsmodul gekoppelt und nicht wie das APG350 mit einem Fc-Teil verknüpft. Die durchgeführten Zelltod-Untersuchungen veranschaulichen, dass alle drei TRAIL-Rezeptor-Agonisten den apoptotischen Signalweg in gleichem Ausmaß in Panc89-, PancTul- und Colo357-Zellen induzierten und somit ähnlich biologisch aktiv sind. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Konstrukte eine gewisse Stabilität aufweisen und dass die Fusion von Dimerisierungsmotiven (wie z.B. einem Antikörperfragment) mit hexameren TRAIL zu einer effektiven Multimerisierung der TRAIL-Rezeptoren in PDAC-Zellen führte.

Ein Vergleich von hexameren APG350 und trimeren TRAIL wurde ebenfalls nach der gleichen massenbezogenen Konzentration (3 mg/ kg Körpergewicht der Maus) *in vivo* vorgenommen, um die pharmakologische Wirkung von APG350 näher zu untersuchen. Dazu wurde das präklinische orthotope Xenotransplantationsmodell mit zwei Therapieansätzen gewählt, um die klinische Situation experimentell nachzuahmen: zum einen ist das die R0-Resektion mit anschließender adjuvanter Therapie, die bei Patienten mit einem resektablen Pankreastumor durchgeführt wird und als einzige kurative Therapie für Pankreaskarzinom gilt. Zum anderen ist das die konservative Therapie, die die klinische Situation darstellt, bei dem die Patienten mit einem fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinom mit Chemo- bzw. Radiotherapie palliativ behandelt werden (Tepel et al., 2006; Egberts et al., 2007; Egberts et al., 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuche mit der Zelllinie PancTul zeigen, dass die APG350-Behandlung, anders als unter *in vitro*-Bedingungen, eine signifikante Reduktion sowohl der Primärtumore (um 62 %) als auch der Rezidivtumore (um 74 %) im Vergleich zur Kontroll-Behandlung (PBS-behandelte Tiere) bewirkte. Weiterhin führte die fünftägige APG350-Applikation im adjuvanten Therapieversuch mit der Zelllinie Colo357-Vektor dazu, dass lediglich 18 % der Mäuse in dieser Gruppe einen Rezidivtumor entwickelten, während in der Kontroll-Gruppe 45 % der Tiere einen Rezidivtumor besaßen.

Um die Verweildauer der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen APG350 und TRAIL *in vivo* näher zu untersuchen, wurde in den konservativen Therapie-Versuchen die Konzentration von APG350 bzw. TRAIL im Serum bestimmt. Hier zeigt sich, dass die APG350-Konzentration im Blut der SCID-bg-Mäuse deutlich höher war und dies zu einer stärkeren Reduktion (um 57 %) der PancTul-Tumore im Vergleich zu TRAIL bewirkte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das hexamere APG350 mit seinem größeren Molekulargewicht von 170 kDa länger im zirkulierenden Blut der Maus verbleibt und somit eine effektivere Wirkung auf den Tumor hatte als das trimere TRAIL. Die Wirkung von APG350 bzw. TRAIL wird durch eine Vielzahl an biologischen Prozessen wie Stoffwechsel und Ausscheidung beeinflusst. In einer pharmakokinetischen Studie konnte gezeigt werden, dass das hexamere APG350 eine Halbwertszeit von 28 h besaß, während diese im Falle des trimeren TRAIL bereits nach 1 h erreicht wurde (Gieffers et al., 2013).

Diese Daten zeigen, dass die biologische Wirkung und demnach die Bioverfügbarkeit von der Molekülgröße und der damit verbundenen Penetration der Substanz in das Gewebe abhängig ist. In einer Untersuchung zur biologischen Verfügbarkeit von Antikörperfragmenten *in vivo* wurde anhand der Halbwertszeit der Substanzen herausgefunden, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht von 150 kDa solide Tumore deutlich langsamer penetrieren als es für kleinere Moleküle von 30 kDa beobachtet werden konnte (Holliger et al., 2008). Dennoch haben die Substanzen größerer Molekülgröße den Vorteil, dass sie länger im Zielgewebe verweilen und eine deutlich höhere Halbwertszeit besaßen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zu dem Vergleich der Wirkung von hexameren APG350 und trimeren TRAIL nach der massenbezogenen Konzentration auch die Wirkung von APG350 und TRAIL nach der stoffmengenbezogenen Konzentration *in vitro* vorgenommen, um direkt einen Vergleich der beiden Substanzen nach der Anzahl der Moleküle vorzunehmen. Die Zelltod-Untersuchungen zeigen, dass die Apoptose-auslösende Wirkung von hexameren APG350 mit der des trimeren TRAIL identisch war. Demnach führt die vergleichbare Anzahl der TRAIL-Moleküle zu der vergleichbaren Wirkung von APG350 und TRAIL. Es konnte für Panc89-, PancTul- und Colo357-Zellen gezeigt werden, dass

APG350 durch die Prozessierung der Initiatorcaspase-8, die Spaltung von BID und darauffolgend durch die Spaltung des Casapse-3 Substrates PARP die mitochondriale apoptotische Signalkaskade induzierte und somit der Zelltod eingeleitet wurde.

Diese vorliegenden Ergebnisse sind einzigartig, da ein Vergleich der beiden Substanzen nach der massenbezogenen - bzw. nach der stoffmengenbezogenen Konzentration bisher in der Literatur nicht zu finden sind. Lediglich ein Vergleich von APG350 und TRAIL nach deren stoffmengenbezogenen Konzentration ist beschrieben (Gieffers et al., 2013). Hierbei konnte, im Gegensatz zu den Daten, die in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, beobachtet werden, dass das hexamere APG350 durch die DISC-Formierung zu einer stärkeren Induktion der Caspase-8 und nachfolgend zur effektiveren Aktivierung der apoptotischen Signaltransduktionskaskade in den untersuchten Kolon-, Leber-, Lungen- und Brustkarzinomzelllinien führte (Gieffers et al., 2013). Bei Betrachtung der EC50-Werte zeigte sich, dass diese Tumorzellen unterschiedlich stark auf die Behandlung ansprachen. Diese Beobachtung wurde auch in den Zelltod-Untersuchungen mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten drei PDAC-Zelllinien gemacht. Dabei korreliert die Induktion der Apoptose mit der Sensitivität der getesteten PDAC-Zellen (Trauzold et al., 2003). Panc89- und Colo357-Zellen sind deutlich sensitiver als PancTul-Zellen, was die Behandlung sowohl mit trimeren TRAIL als auch mit hexameren APG350 *in vitro* und *in vivo* belegte. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits gemachten Beobachtungen von Lemke *et al.*, dass die Apoptose-sensitiven PDAC-Zellen mit vermehrtem Zelltod auf die Stimulation mit trimeren TRAIL ansprechen (Lemke et al., 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwies sich das APG350 somit als ein potenter Apoptose-Induktor bei Apoptose-sensitiven PDAC-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Für das trimere TRAIL und auch für das hexamere APG30 ist bekannt, dass es an beide Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 binden kann und deren Clustering an der Zelloberfläche bewirkt (Gieffers et al., 2013). In dieser Arbeit wurden die PDAC-Zelllinien PancTul, Colo357 und Panc89 verwendet, da sie die für die apoptotische Antwort bedeutsamen Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an der Zellmembran exprimieren (Lemke et al., 2010; Voigt et al., 2014). Interessanterweise konnte anhand der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen an den Tumoren gezeigt werden, dass die Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auch intrazellulär im Zytoplasma zu finden sind. Die Todesrezeptoren waren stärker in den Rezidivtumoren als in den Primärtumoren exprimiert. Diese Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass sich das Expressionsmuster von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 während der Karzinogenese verändert. Über die Expression der Todesrezeptoren im Primärtumor, im Rezidivtumor und auch in Fernmetastasen ist bisher wenig bekannt. Einige Studien für solide

Tumore belegen, dass die intrazelluläre Expression der TRAIL-Rezeptoren mit prognostischen Markern korreliert und die hohe Expression ein ungünstiger Prognosefaktor für die erkrankten Patienten darstellt (Sträter et al., 2002; Ganten et al., 2009; Bavi et al., 2010; Haselmann et al., 2014; Bertsch et al., 2014; Karstedt et al., 2015).

Eine hohe intrazelluläre Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL führt bei der Mehrzahl der Tumorzellen zur TRAIL-Resistenz. Auch konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen während der TRAIL-Therapie aufgrund einer Selektion resistenter Zellen eine Apoptoseresistenz entwickeln (Herbst et al., 2010; Soria et al., 2010). Viele Tumorzellen, so auch die des PDAC, sind intrinsisch wegen einer hohen Expression von Bcl-xL oder anderen anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Superfamilie vor der TRAIL-vermittelten Apoptose geschützt (Hinz et al., 2000; Munshi et al., 2001; Fulda et al., 2002). Die Colo357 Bcl-xL-Zellen zeigten eine erhöhte Apoptoseresistenz und reagierten zudem auf die TRAIL-Behandlung mit der gesteigerten Entwicklung von Lebermetastasen *in vivo* (Hinz et al., 2000; Trauzold et al., 2003; Trauzold et al., 2006).

Um den Einfluss der APG350-Therapie auf Apoptose-resistente PDAC-Zellen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Colo357-Zellen mit hoher Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL (Colo357-Bcl-xL-Zellen) verwendet. Parallel dazu wurden die Zelltod-Untersuchungen an Apoptose-sensitiven Colo357-Zellen (Colo357-Vektor) durchgeführt.

Die *in vitro*-Versuche verdeutlichen, dass die Colo357 Bcl-xL Zellen resistenter als die Colo357-Vektor-Kontrollzellen gegenüber APG350 sind. In beiden Zelllinien konnte eine starke APG350-induzierte Prozessierung der Caspase-8 beobachtet werden. Wie erwartet, wurde aber eine deutlich verminderte Spaltung des Caspase-3 Substrates PARP in den Colo357 Bcl-xL-Zellen als in den Kontrollzellen nachgewiesen. Das ist daher begründet, dass PDAC-Zellen sogenannte Typ-II-Zellen sind, die für die Induktion der Apoptose die Weiterleitung des Signales über den mitochondrialen Signalweg benötigen, um die Aktivierung der Effektorcaspasen zu gewährleisten. Das anti-apoptotische Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Mitochondrienintegrität und kann somit die Aktivierung von Bax und Bak beeinflussen (Wang, 2001). Da die Spaltung der Initiatorcaspasen vor der mitochondrialen Integration stattfindet, konnte in beiden Zelllinien die Prozessierung von Caspase-8 gesehen werden. Durch die Überexpression von Bcl-xL in den Colo357 Bcl-xL-Zellen wird die Bax/ Bak-Aktivierung blockiert und darauffolgend die Weiterleitung des apoptotischen Signals durch die Aktivierung der Effektorcaspasen unterbunden, was zur Hemmung der Apoptose in den Colo357 Bcl-xL-Zellen führte.

Die Beobachtung der verminderten Sensitivität der Colo357 Bcl-xL-Zellen gegenüber der Apoptose konnten auch in den *in vivo*-Versuchen gesehen werden. Die Behandlung mit APG350 konnte weder die Masse der Colo357 Bcl-xL-Primärtumore noch der Colo357 Bcl-xL-Rezidivtumore reduzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Resistenz einen Überlebensvorteil für die Krebszellen darstellt. Eine Möglichkeit zur Umgehung der Resistenz ist die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Bcl-xL-Inhibitoren. Eine Vielzahl an Studien belegt, dass die Substanzen ABT-737 und WEHI-539, beides Inhibitoren von Bcl-xL, mit hoher Affinität an Bcl-2 bzw. Bcl-xL binden können und für die Therapie verschiedener Krebsarten vielversprechende Wirkungen zeigen (Delft et al., 2006; Konopleva et al., 2006; Lessene et al., 2013; Roy et al., 2014). In zukünftigen Versuchen müsste der Fokus daher auf eine Kombination von hexameren TRAIL mit Bcl-xL-Inhibitoren gelegt werden, um die Tumorzellen, die konstitutiv Bcl-xL überexprimieren, eliminieren zu können.

Ein weiterer Grund für das geringe Ansprechen der Tumorzellen auf die TRAIL-Therapie ist neben der Apoptose-Resistenz die Tatsache, dass die TRAIL-Rezeptoren in der Lage sind, diverse nicht-apoptotische Signalwege zu induzieren. Für PDAC-Zellen ist beschrieben, dass rekombinantes TRAIL über seine Todesrezeptoren die Aktivierung von PKC, p38, p42/44, JNK und der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 verursacht (Trauzold et al., 2001; Siegmund et al., 2007), was im Folgenden zur Steigerung der Inflammation, der Zellproliferation, der Migration, der Invasion und der Metastasierung führt (Trauzold et al., 2006; Hoogwater et al., 2010; Azijli et al., 2013).

Da für das hexamere APG350 eine Induktion von nicht-apoptotischen pro-inflammatorischen Signalwegen bisher nicht beschrieben ist, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die APG350-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B *in vitro* analysiert und ein Vergleich mit trimeren TRAIL durchgeführt werden.

Es konnte für die Colo357-Zellen gezeigt werden, dass das hexamere APG350 die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK weniger stark induzierte als das trimere TRAIL. Hingegen induzierte APG350 vermehrt den NF- κ B-Signalweg in den getesteten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Signaltransduktion der nicht-apoptotischen Signalwege parallel zu der Induktion des apoptotischen Signalweges abläuft.

Die Unterbindung des apoptotischen Signalweges ist ein zellphysiologischer Vorgang und spielt bei der malignen Transformation der Zellen eine zentrale Rolle (Hanahan et al., 2011). Um die nicht-apoptotische Signaltransduktion durch APG350 ohne Einfluss der Apoptose näher zu untersuchen, wurden die Bcl-xL-überexprimierenden Colo357-Zellen mit APG350 bzw. TRAIL stimuliert und die Wirkung der Substanzen nach identischer stoffmengenbezogenen Konzentration verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die TRAIL-vermittelte Aktivierung der Signalwege p38, JNK und p42/44 in der Apoptose-resistenten Zelllinie weniger prägnant war als in der Apoptose-sensitiven Zelllinie. Hingegen wurde eine starke Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in den Apoptose-resistenten Colo357-Bcl-xL-Zellen beobachtet. Die verstärkte TRAIL-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in den Colo357 Bcl-xL-Zellen deckt sich mit den Beobachtungen vorangegangener Untersuchungen (Siegmund et al., 2007). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt zur Hemmung der Apoptose und parallel dazu zur Induktion der Expression von IL-8, MCP-1, MMPs und uPA (Trauzold et al., 2006).

Werden die beiden Substanzen APG350 und TRAIL miteinander verglichen, so wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit eine vergleichbar starke Aktivierung der Signalwege p38, JNK, p42/44 und NF- κ B in den Colo357-Bcl-xL-Zellen induziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das hexamere APG350 genauso wie das trimere TRAIL die nicht-apoptotischen pro-inflammatorischen Signalwege induziert.

Da die Aktivierung von Kinasen und von NF- κ B sowohl in der Apoptose-sensitiven als auch in der Apoptose-resistenten Zelllinie nachweisbar war, scheint es, als würde die TRAIL- bzw. APG30 vermittelte Aktivierung der nicht-apoptotischen Signalwege unabhängig vom apoptotischen Signalweg ablaufen. Diese Beobachtungen wurden auch in einer Untersuchung an sensitiven und resistenten HeLa-Zellen gemacht (Mühlenbeck et al., 1998). Hier führte ebenfalls die Behandlung zur TRAIL-vermittelten Aktivierung des JNK-Signalweges in beiden Zelllinien.

In den Experimenten von Siegmund *et al.* wurde untersucht, welche Rolle die für den apoptotischen Signalweg wichtigen Caspasen für die Aktivierung der nicht-apoptotischen Signalwege spielen. Zur Unterbindung der Apoptose wurden die PDAC-Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen-Signalwege und des NF- κ B-Signalweges abhängig von den Caspasen abläuft (Siegmund et al., 2007). Weitere Studien bestätigen diese Aussage, dass die Unterbindung der Apoptose durch Caspase-Inhibitoren zu einer Verstärkung der TRAIL-induzierten NF- κ B Aktivierung führte (Wajant et al., 2000; Trauzold et al., 2001; Harper et al., 2001; Kumar-Sinha et al., 2002).

Um die TRAIL- bzw. APG350-vermittelte Aktivierung der pro-inflammatorischen Signaltransduktion weiter zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Chemokin IL-8 im Zellkulturüberstand von behandelten Apoptose-sensitiven und Apoptose-resistenten Colo357-Zellen mittels eines ELISA-Kits detektiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die Induktion der nicht-apoptotischen Signalwege zu einer hohen Expression von IL-8 in Colo357 Bcl-xL-Zellen sowohl durch trimeres TRAIL auch als durch hexameres APG350 führte. Dabei erwiesen sich beide Substanzen als gleich starke Induktoren von IL-8.

Diese Daten belegen, dass der apoptotische Signalweg durch die intrinsische Resistenz in den Bcl-xL-überexprimierenden Colo357-Zellen unterbunden wurde und dies zur Verstärkung der TRAIL-vermittelten NF- κ B-Signalweges *in vitro* führte.

Da die Behandlung von Apoptose-resistenten PDAC-Tumoren mit rekombinanten TRAIL zu einer Steigerung der Lebermetastasierung führte (Trauzold et al., 2006), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss der APG350-Therapie auf die Lebermetastasierung *in vivo* analysiert.

Im konservativen Therapieansatz mit den Apoptose-resistenten Colo357 Bcl-xL-Tumoren führte die Behandlung mit APG350 bzw. mit TRAIL dazu, dass 3 von 8 Mäuse Metastasen in der Leber entwickelten. Im Vergleich zur Kontrolle (PBS-behandelte Tiere) führte die Therapie mit den beiden unterschiedlichen TRAIL-Formen zu keiner signifikanten Erhöhung der Metastasierung. Diese Ergebnisse widerlegen die von Trauzold *et al.* publizierten Beobachtung der gesteigerten peritonealen Aussaat (Trauzold et al., 2006). In dieser Studie wurde die TRAIL-Therapie drei Mal in einem Intervall von drei Tagen (10., 13. und 16. postoperativen Tag) durchgeführt, während in den Tierversuchen der vorliegenden Arbeit die Therapie mit TRAIL bzw. mit APG350 an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (4. bis 8. postoperativen Tag) erfolgte.

Diese Daten deuten darauf hin, dass der Beginn und die Dauer der therapeutischen Intervention entscheidende Parameter sind und sowohl in präklinischen Versuchen als auch in klinischen Studien berücksichtigt werden sollten.

Da die Mehrzahl der Patienten mit einem Pankreaskarzinom ein Lokalrezidiv in der Nähe des resezierten Primärtumors entwickeln (Sohn et al., 2000; Lim et al., 2003), wurde im Rahmen dieser Arbeit in den adjuvanten Therapieversuchen das Wachstum eines lokalen Rezidivtumors mittels MRT-Scans untersucht. Die Daten zeigen, dass die Tiere aller Behandlungsgruppen einen PancTul-Rezidivtumor aufwiesen, der bei den behandelten Gruppen (TRAIL- bzw. APG350-Therapie) signifikant kleiner war. Das der Ki67-Proliferationsindex sowie der Angiogenese-Marker CD31 in den behandelten Tumoren unverändert war im Vergleich zu den Kontroll-Tumoren (PBS-behandelt) kann daher begründet werden, dass die adjuvante Therapie vier Tage nach der Resektion des Primärtumors begann und die Substanzen lediglich in einer Zeitspanne von fünf Tagen appliziert wurden. Somit wurde die Größe der Rezidivtumore durch die Behandlung mit APG350 bzw. durch die Behandlung mit TRAIL reduziert. Es konnte mit diesem fünf-tägigen Therapiekonzept gezeigt werden, dass das APG350 eine therapeutisch wirksame Substanz für PancTul-Rezidive darstellt jedoch müsste in weiteren Versuchen die systemische APG350-Applikation auch in Bezug auf die Steigerung der pro-inflammatorischen Antwort näher untersucht werden.

Im Ansatz mit den Apoptose-sensitiven Colo357-Vektor-Zellen konnte eine deutliche Reduzierung der lokalen Rezidive in allen Behandlungsgruppen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu führte in dem Ansatz mit den Apoptose-resistenten Colo357-Bcl-xL-Zellen die chirurgische Operation dazu, dass in allen Behandlungsgruppen lediglich bei 6 von 11 Mäusen (PBS-Gruppe) bzw. bei 5 von 11 Mäusen (TRAIL-/ APG350-Gruppe) ein Rezidivtumor vorhanden war. Jedoch zeigten alle Tiere mit einem lokalen Tumor ähnlich großer Masse, was anhand des Ki67-Proliferationsindex ersichtlich wurde.

Es ist beschrieben, dass die chirurgische Resektion des Tumors mit einer erhöhten inflammatorischen Antwort einhergeht und die Ausprägung einer Rezidivkrankheit somit begünstigt wird. Für das PDAC wurde gezeigt, dass eine spezifische Hemmung von TNF- α mittels Infliximab und Etanercept (TNF α -Inhibitoren) zu einem deutlich verringerten Tumorwachstum sowie zu einer Reduzierung der Lebermetastasierung führte (Egberts et al., 2008). Eine weitere Studie verdeutlicht, dass die Inhibierung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 mittels eines Antikörpers Tocilizumab ebenfalls das Tumorwachstum drastisch reduzierte (Goumas et al., 2015).

Im Einklang mit den bereits publizierten Daten von Trauzold et al. konnte bei der adjuvanten Therapie mit den Apoptose-resistenten Colo357 Bcl-xL-Tumoren gezeigt werden, dass trimeres TRAIL zu einer gesteigerten Lebermetastastasierung führte (Trauzold et al., 2006). Demgegenüber hatte die konservative Therapie mit dem hexameren APG350 eine geringere Metastasen-Aussaat in der Leber in diesem Versuchsansatz.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung des apoptotischen Signalweges in den Colo357 Bcl-xL-Tumoren zu einer Verringerung der Metastasierung durch das APG350 führte. Weitere Versuche sind nötig, um die Aktivierung von nicht-apoptotischen pro-inflammatorischen Signalwegen *in vivo* näher zu untersuchen. So könnte eine Analyse von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-8 im Mausserum Aufschluss über die Immun- und Entzündungsreaktion geben.

Zusammenfassend lässt sich für Apoptose-sensitive PDAC-Zellen sagen, dass die Stimulation mit hexameren APG350 zur Einleitung des mitochondrialen apoptotischen Signalweges und zur verminderten Aktivierung von nicht-apoptotischen pro-inflammatorischen Signalwegen im Vergleich zu trimeren TRAIL führt. Weiterhin offenbaren die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, dass die APG350-Behandlung in den Apoptose-resistenten PDAC-Zellen aufgrund der intrinsischen Resistenz zu einer signifikant verringerten Zelltodinduktion gegenüber den Apoptose-sensitive Zellen unter *in vitro* Bedingungen führt. In den durchgeführten orthotopen Xenograft-Transplantationsmodellen an immundefizienten Mäusen konnte eine verminderte Metastasierung der Tumorzellen in

die Leber unter APG350-Therapie festgestellt werden. Weiterhin offenbaren die Daten, dass die Wirkung der beiden Substanzen APG350 und TRAIL von deren Konzentration bzw. deren Dosis abhängig ist und dieser Aspekt sollte in der TRAIL-basierten Therapie bei der Entwicklung von zukünftigen neuen Formen von rekombinanten TRAIL unbedingt berücksichtigt werden.

5. Ausblick und Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die therapeutische Wirkung des hexavalenten TRAIL-Rezeptor-Agonisten APG350 auf PDAC-Zellen mit unterschiedlicher Apoptose-Sensitivität. Die durchgeführten Versuche offenbarten die APG350-induzierte Signaltransduktion von apoptotischen und nicht-apoptotischen pro-inflammatorischen Signalwegen und geben einen kritischen Vergleich der therapeutischen Effekte von hexameren APG350 und trimeren TRAIL. In einem nächsten Schritt ist es wichtig, die Wirkung von APG350 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika bzw. mit der Behandlung von Inhibitoren zur Unterbindung der pro-inflammatorischen Signaltransduktion zu untersuchen. Diese weiterführende Forschungsarbeit ist unbedingt notwendig, um die neu entwickelten Formen von rekombinanten TRAIL (TRAIL-Rezeptor-Agonisten) als potentielle Substanzen für die Tumorthherapie in Zukunft einsetzen zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, C., Totpal, K., Lawrence, D., Marsters, S., Pitti, R., Yee, S., Ross, S., et al. (2008). Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. *Cell Death and Differentiation*, 15, 751-761.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., et al. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(2), 155-162.
- Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G. J., Jong, S. D., & Kruyt, F. A. E. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death and Differentiation*, 20(7), 858-868.
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews*, 9, 361-371.
- Bavi, P., Prabhakaran, S. E., Abubaker, J., Qadri, Z., George, T., Al-Sanea, N., Abduljabbar, A., et al. (2010). Prognostic significance of TRAIL death receptors in Middle Eastern colorectal carcinomas and their correlation to oncogenic KRAS alterations. *Molecular Cancer*, 9, 1-13.
- Belada, D., Mayer, J., Czuczman, M., Flinn, I., Durbin-Johnson, B., & Bray, G. (2010). Phase II study of dulanerin plus rituximab in patients with relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Journal of Clinical Oncology*, 24, 2104.
- Belch, A., Sharma, A., Spencer, A., Tarantolo, S., Bahlis, N. ., & Doval, D. (2010). A multicenter randomized phase ii trial of mapatumumab, a TRAIL-R1 agonist monoclonal antibody, in combination with bortezomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma (MM). *Blood*, 116, abstract 5031.
- Bertsch, U., Röder, C., Kalthoff, H., & Trauzold, A. (2014). Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions : emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death and Disease*, 5, 1-10.
- Beutler, B., & Huffel, C. V. (1994). Unraveling Function in the TNF Ligand and Receptor Families. *Science*, 264, 667-668.
- Bilimoria, K. Y., Bentrem, D. J., Ko, C. Y., Tomlinson, J. S., Stewart, A. K., Winchester, D. P., & Talamonti, M. S. (2007). Multimodality Therapy for Pancreatic Cancer in the U.S. *Cancer*, 110, 1227-1234.
- Bodmer, J.-L., Meier, P., Tschopp, J., & Schneider, P. (2000). Cysteine 230 Is Essential for the Structure and Activity of the Cytotoxic Ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20632-20637.
- Brown, L. M. (2005). Epidemiology of alcohol-associated cancers. *Alcohol*, 35, 161-168.
- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E., & Giaccone, G. (2005). Cell Death Independent of Caspases : A Review. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3155-3163.

- Burris, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., et al. (1997). Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *15*(6), 2403-2413.
- Camidge, D. R., Herbst, R. S., Gordon, M. S., Eckhardt, S. G., Kurzrock, R., Durbin, B., Ing, J., et al. (2010). A Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of the Death Receptor 5 Agonistic Antibody PRO95780 in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research*, *16*(4), 1256-1264.
- Cha, S.-S., Kim, M.-S., Choi, Y. H., Sung, B.-J., Shin, H.-C., Sung, Y. C., & Oh, B.-H. (1999). A Resolution Crystal Structure of Human TRAIL, a Cytokine with Selective Antitumor Activity. *Immunity*, *11*, 253-261.
- Chari, S. T., Leibson, C. L., Rabe, K. G., Ransom, J., Andrade, M. D. E., & Petersen, G. M. (2005). Probability of Pancreatic Cancer Following Diabetes: A Population-Based Study. *Gastroenterology*, *129*, 504-511.
- Chawla, S., Tabernero, J., Kindler, H., Chiorean, E., LoRusso, P., & Hsu, M. (2010). Phase I evaluation of the safety of conatumumab (AMG 655) in combination with AMG 479 in patients (pts) with advanced, refractory solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, *28*, abstract 3102.
- Cohn, A., Tabernero, J., Maurel, J., Nowara, E., Sastre, J., Chuah, B., Kopp, M., et al. (2013). A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant KRAS metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, *24*, 1177-1785.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., et al. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *364*, 1817-1825.
- Cooper, W. A., Kohonen-Corish, M. R., Zhuang, L., McCaughan, B., Kennedy, C., Screaton, G., Sutherland, R. L., et al. (2008). Role and Prognostic Significance of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Death Receptor DR5 in Nonsmall-Cell Lung Cancer and Precursor Lesions. *Cancer*, *113*, 135-42.
- Creagan, E., Kovach, J., Moertel, C., Frytak, S., & Kvols, L. (1988). A Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer*, *62*, 2467-2471.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. (1997). The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity*, *7*, 813-820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.-P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., et al. (1997). Cloning and Characterization of TRAIL-R3, a Novel Member of the Emerging TRAIL Receptor Family. *J. Exp. Med.*, *186*(7), 2-7.
- Delft, M. F. V., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., Willis, S. N., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, *10*, 389-399.

- Demetri, G. D., Le Cesne, A., Chawla, S. P., Brodowicz, T., Maki, R. G., Bach, B. A., Smethurst, D. P., et al. (2012). First-line treatment of metastatic or locally advanced unresectable soft tissue sarcomas with conatumumab in combination with doxorubicin or doxorubicin alone: A Phase I / II open-label and double-blind study. *European Journal of Cancer*, 48(4), 547-563.
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., Funakoshi, A., et al. (2008). Surgery Versus Radiochemotherapy for Resectable Locally Invasive Pancreatic Cancer: Final Results of a Randomized Multi-Institutional Trial. *Surg Today*, 38, 1021-1028.
- Doi, T., Murakami, H., Ohtsu, A., Fuse, N., Yoshino, T., Yamamoto, N., Boku, N., et al. (2011). Phase 1 study of conatumumab, a pro-apoptotic death receptor 5 agonist antibody, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68, 733-741.
- Duell, E. J., Holly, E. A., Bracci, P. M., Liu, M., Wiencke, J. K., & Kelsey, K. T. (2002). A Population-Based, Case – Control Study of Polymorphisms in Carcinogen-Metabolizing Genes, Smoking, and Pancreatic Adenocarcinoma Risk. *J Natl Cancer Inst*, 94, 297-306.
- Egberts, J.-H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., et al. (2008). Anti – Tumor Necrosis Factor Therapy Inhibits Pancreatic Tumor Growth and Metastasis Growth and Metastasis. *Cancer Research*, 68, 1443-1450.
- Egberts, J.-H., Schniewind, B., Sipos, B., Hinz, S., Kalthoff, H., & Tepel, J. (2007). Superiority of Extended Neoadjuvant Chemotherapy with Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 6, e1-e6.
- Eggermont, A., Steller, E., & Sugarbaker, P. (1997). Laparotomy enhances intraperitoneal tumor growth and abrogates the antitumor effects of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Surgery*, 102(1), 71-8.
- EI-Deiry, W. S. (2001). Insights into cancer therapeutic design based on p53 and TRAIL receptor signaling. *Cell Death and Differentiation*, 8, 1066-1075.
- Elrod, H. A., Fan, S., Muller, S., Chen, G. Z., Pan, L., Tighiouart, M., Shin, D. M., et al. (2010). Analysis of Death Receptor 5 and Caspase-8 Expression in Primary and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Prognostic Impact. *Plos One*, 5(8), 1-10.
- Emery, J. G., Mc Donnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., et al. (1998). Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14363-14367.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., & Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: Decisions between life and death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1462-1475.
- Forero-Torres, A., Infante, J. R., Waterhouse, D., Wong, L., Vickers, S., Arrowsmith, E., He, A. R., et al. (2013). Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Medicine*, 2, 925-932.

- Forero-Torres, A., Shah, J., Wood, T., Posey, J., Carlisle, R., Copigneaux, C., Luo, F., et al. (2010). Phase I Trial of Weekly Tigatuzumab, an Agonistic Humanized Monoclonal Antibody Targeting Death Receptor 5 (DR5). *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(1), 13-19.
- Fuchs, C. S., Fakih, M., Schwartzberg, L., Cohn, A. L., Yee, L., Dreisbach, L., Kozloff, M. F., et al. (2013). TRAIL Receptor Agonist Conatumumab With Modified FOLFOX6 Plus Bevacizumab for First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer*, 119, 4290-4298.
- Fulda, S., Meyer, E., & Debatin, K.-M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21, 2283-2294.
- Ganten, T M, Haas, T. L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M., Fas, S., Krueger, A., et al. (2004). Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death and Differentiation*, 11, 86-96.
- Ganten, Tom M, Sykora, J., Koschny, R., Batke, E., Aulmann, S., Mansmann, U., Stremmel, W., et al. (2009). Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med*, 87, 995-1007.
- Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T. L., Diessenbacher, P., Sprick, M., Schön, M., et al. (2008). Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene*, 27, 3211-3220.
- Gieffers, C., Kluge, M., Merz, C., Sykora, J., Thiemann, M., Schaal, R., Fischer, C., et al. (2013). APG350 Induces Superior Clustering of TRAIL Receptors and Shows Therapeutic Antitumor Efficacy Independent of Cross-Linking via Fcγ Receptors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12, 2735-2748.
- Goldstein, D., El-Maraghi, R. H., Hammel, P., Heinemann, V., Kunzmann, V., Sastre, J., Scheithauer, W., et al. (2015). nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer : Long-Term Survival From a Phase III Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 107, 1-10.
- Goumas, F. A., Holmer, R., Egberts, J.-H., Gontarewicz, A., Heneweer, C., Geisen, U., Hauser, C., et al. (2015). Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 00, 1-12.
- Graves, J. D., Kordich, J. J., Huang, T.-H., Piasecki, J., Bush, T. L., Sullivan, T., Foltz, I. N., et al. (2014). Apo2L/ TRAIL and the Death Receptor 5 Agonist Antibody AMG 655 Cooperate to Promote Receptor Clustering and Antitumor Activity. *Cancer Cell*, 26(2), 177-189.
- Greco, F. A., Bonomi, P., Crawford, J., Kelly, K., Oh, Y., Halpern, W., Lo, L., et al. (2008). Phase 2 study of mapatumumab , a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1 , in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 61, 82-90.
- Gruss, H.-J., & Dower, S. K. (1995). Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily: Involvement in the Pathology of Malignant Lymphomas. *Blood*, 85(12), 3378-3404.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M., & MacFarlane, M. (2001). Modulation of Tumor Necrosis Factor Apoptosis-inducing Ligand- induced NF-kB Activation by Inhibition of Apical Caspases. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34743-34752.
- Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Müller, M. O., Fritsch, J., Häslner, R., et al. (2014). Nuclear Death Receptor TRAIL-R2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor Cells. *Gastroenterology*, 146(1), 278-290.
- Herbst, R. S., Eckhardt, S. G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., Dwyer, P. J. O., Gordon, M. S., Novotny, W., et al. (2010). Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L / TRAIL , a Dual Proapoptotic Receptor Agonist , in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(17), 2839-2846.
- Herbst, R. S., Kurzrock, R., Hong, D. S., Valdivieso, M., Hsu, C.-pang, Goyal, L., Juan, G., et al. (2010). A First-in-Human Study of Conatumumab in Adult Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 16, 5883-5892.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., et al. (2000). Bcl-X L protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19, 5477-5486.
- Hoff, D. D. V., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., et al. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med*, 369(18), 1691-1703.
- Holland, P. (2014). Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor*, 25(2), 185-193.
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2008). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126-1136.
- Hoogwater, F., Nijikamp, M. W., Smakman, N., Steller, E. J. A., Emmink, B. L., Westendorp, B. F., Raats, D. A. E., et al. (2010). Oncogenic K-Ras Turns Death Receptors Into Metastasis-Promoting Receptors in Human and Mouse Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology*, 138(7), 2357-2367.
- Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J.-L., Bours, K. B., Brognara, C. B., Tschopp, J., & Gross, N. (2000). Loss of Caspase-8 Expression in Highly Malignant Human Neuroblastoma Cells Correlates with Resistance to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis. *Cancer Research*, 30, 4315-4319.
- Hotte, J., Hirte, H. W., Chen, E. X., Siu, L. L., Le, L. H., Corey, A., Iacobucci, A., et al. (2008). A Phase I Study of Mapatumumab (Fully Human Monoclonal Antibody to TRAIL-R1) in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clinical Cancer Research*, 14, 3450-3456.
- Howard, B. D., Boenicke, L., Schniewind, B., Henne-Bruns, D., & Kalthoff, H. (2000). Transduction of human pancreatic tumor cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retroviral vectors containing a herpes simplex virus thymidine kinase mutant gene enhances bystander effects and sensitivity to ganciclovir. *Cancer Gene Therapy*, 7(6), 927-938.

- Hristov, A. C., Cope, L., Reyes, M. D., Singh, M., Iacobuzio-Donahue, C., Maitra, A., & Resar, L. M. S. (2009). HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 22(1), 43-49.
- Hylander, B. L., Pitoniak, R., Penetrante, R. B., Gibbs, J. F., Oktay, D., Cheng, J., & Repasky, E. A. (2005). The anti-tumor effect of Apo2L / TRAIL on patient pancreatic adenocarcinomas grown as xenografts in SCID mice. *Journal of Translational Medicine*, 3, 1-13.
- Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., Connell, M. O., Kelley, R. F., Ashkenazi, A., et al. (1999). Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/ TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Molecular Cell*, 4, 563-571.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.-L., et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.
- Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, 129-136.
- Jaffee, E. M., Hruban, R. H., Canto, M., & Kern, S. E. (2002). Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell*, 2, 25-28.
- Jo, M., Kim, T.-H., Seol, D.-W., Esplen, J. E., Dorko, K., Billiar, T. R., & Strom, S. C. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature Medicine*, 6(5), 3-6.
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C. S., Bouillet, P., et al. (2009). XIAP discriminates between type I and type II Fas-induced apoptosis. *Nature*, 460(7258), 1035-1039.
- Kaplan-Lefko, P., Graves, J., Zoog, S., Pan, Y., Wall, J., Branstetter, D., Moriguchi, J., et al. (2010). Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol Ther*, 9, 618-31.
- Karstedt, S. von, Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., et al. (2015). Cancer Cell-Autonomous TRAIL-R Signaling Promotes KRAS-Driven Cancer Progression, Invasion, and Metastasis. *Cancer Cell*, 27, 1-13.
- Kasubhai, S., Bendell, J., Kozloff, M., Kapp, A., Ashkenazi, A., & Royer-Joo, S. (2013). Phase Ib study of dulanermin combined with FOLFIRI (with or without bevacizumab [BV]) in previously treated patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 30, abstract 3543.
- Kate, T. M., Hofland, L. J., Grevenstein, V. W. M., Koetsveld, V. P. V., Jeekel, J., & Eijck, C. H. (2004). Influence of Proinflammatory Cytokines on the Adhesion of human Colon Carcinoma Cells to Lung Microvascular Endothelium. *Int J Cancer*, 112, 943-950.
- Kelley, R. F., Totpal, K., Lindstrom, S. H., Mathieu, M., Billeci, K., DeForge, L., Pai, R., et al. (2005). Receptor-selective Mutants of Apoptosis-inducing Ligand 2 / Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Reveal a Greater Contribution of Death Receptor (DR) 5 than DR4 to Apoptosis Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 2205-2212.

- Kelley, S. K., Harris, L. A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., Fox, J. A., et al. (2001). Preclinical Studies to Predict the Disposition of Apo2L / Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Humans : Characterization of in Vivo Efficacy , Pharmacokinetics , and Safety. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(1), 31-38.
- Kim, K., Fisher, M. J., Xu, S.-Q., & El-Deiry, W. S. (2000). Molecular Determinants of Response to TRAIL in Killing of Normal and Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 335-346.
- Kim, S.-hyun, Kim, K., Kwagh, J. G., Dicker, D. T., Herlyn, M., Rustgi, A. K., Chen, Y., et al. (2004). Death Induction by Recombinant Native TRAIL and Its Prevention by a Caspase 9 Inhibitor in Primary Human Esophageal Epithelial Cells *. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 40044-40052.
- Kindler, H., Garbo, L., Stephenson, J., Wieszorek, J., Sabin, T., & Hsu, M. (2009). A phase Ib study to evaluate the safety and efficacy of AMG 655 in combination with gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer (PC). *Journal of Clinical Oncology*, 27, abstract 4501.
- Kindler, H., Richards, D., Garbo, L., Garon, E., Stephenson, J., Rocha-Lima, C., Safran, H., et al. (2012). A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG479) or conatumumab (AMG655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Annals of Oncology*, 23, 2834-42.
- Klinke, R., Pape, H.-C., & Silbernagl, S. (2005). *Physiologie, 5. komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart* (pp. 1-930).
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 10, 375-388.
- Koschny, R., Walczak, H., & Ganten, T. M. (2007). The promise of TRAIL — potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med*, 85, 923-935.
- Kuijlen, J. M. A., Mooij, J. J. A., Platteel, I., Hoving, E. W., Graaf, W. T. A. V. D., Span, M. M., Hollema, H., et al. (2006). TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, 78, 161-171.
- Kumar-Sinha, C., Varambally, S., Sreekumar, A., & Chinnaiyan, A. M. (2002). Molecular Cross-talk between the TRAIL and Interferon Signaling Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 575-585.
- Lahm, A., Paradisi, A., Green, D. R., & Melino, G. (2003). Death fold domain interaction in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 10, 10-12.
- Larsson, S., Permert, J., Hakansson, N., Naslund, I., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2005). Overall obesity , abdominal adiposity , diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *British Journal of Cancer*, 93, 1310-1315.

- Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Fox, J. A., Thomas, D., & Ashkenazi, A. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L / TRAIL versions. *Nature Medicine*, 7(4), 2000-2002.
- Lemke, J, Karstedt, S. V., Zinngrebe, J., & Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), 1350-1364.
- Lemke, Johannes, Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Röder, C., Schütze, S., et al. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J Mol Med*, 88, 729-740.
- Leong, S., Cohen, R. B., Gustafson, D. L., Langer, C. J., Camidge, D. R., Padavic, K., Gore, L., et al. (2009). Mapatumumab , an Antibody Targeting TRAIL-R1 , in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Patients With Advanced Solid Malignancies : Results of a Phase I and Pharmacokinetic Study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(26), 4413-4421.
- Lessene, G., Czabotar, P., Sleebs, B., Zobel, K., Lowes, K., Adams, J., Baell, J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat Chem Biol*, 9, 390-397.
- Lim, J. E., Chien, M. W., & Earle, C. C. (2003). Prognostic Factors Following Curative Resection for Pancreatic Adenocarcinoma A Population-Based , Linked Database Analysis of 396 Patients. *Annals of Surgery*, 237(1), 74-85.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M. M., Kelliher, M., Lipkowitz, S., & Liu, Z.-G. (2000). The Death Domain Kinase RIP Is Essential for TRAIL (Apo2L) -Induced Activation of I κ B Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6638-6645.
- MacFarlane, M, Inoue, S., Kohlhaas, S. L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D. B. J., Dyer, M. J. S., et al. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death and Differentiation*, 12, 773-782.
- MacFarlane, Marion, Kohlhaas, S. L., Sutcliffe, M. J., Dyer, M. J. S., & Cohen, G. M. (2005). TRAIL Receptor-Selective Mutants Signal to Apoptosis via TRAIL-R1 in Primary Lymphoid Malignancies. *Cancer Research*, 65(24), 11265-11271.
- Macher-Goeppinger, S., Aulmann, S., Tagscherer, K. E., Wagener, N., Haferkamp, A., Penzel, R., Brauckhoff, A., et al. (2009). Prognostic Value of Tumor Necrosis Factor - Related Apoptosis- Inducing Ligand (TRAIL) and TRAIL Receptors in Renal Cell Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(2), 650-660.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., et al. (1997). A novel receptor for Apo2L / TRAIL contains a truncated death domain. *Current Biology*, 7(12), 1003-1006.
- McCarthy, M. M., Sznol, M., DiVito, K. A., Camp, R. L., Rimm, D. L., & Kluger, H. M. (2005). Evaluating the Expression and Prognostic Value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(14), 5188-5195.
- Merchant, M. S., Geller, J. I., Baird, K., Chou, A. J., Galli, S., Charles, A., Amaoko, M., et al. (2012). Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Lexatumumab in Pediatric Patients With Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 30(33), 4141-4147.

- Michaud, D., Giovannucci, E., Willett, W., Colditz, G., Stampfer, M., & Fuchs, C. (2001). Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA*, *286*, 921-929.
- Micheau, O., Shirley, S., & Dufour, F. (2013). Death receptors as targets. *British Journal of Pharmacology*, *169*, 1723-1744.
- Miguel, D. D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H., & Martinez-Lostao, L. (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death and Differentiation*, 1-15.
- Mom, C. H., Verweij, J., Oldenhuis, C. N. A. M., Gietema, J. A., Fox, N. L., Miceli, R., Eskens, F. A. L. M., et al. (2009). Mapatumumab , a Fully Human Agonistic Monoclonal Antibody That Targets TRAIL-R1 , in Combination with Gemcitabine and Cisplatin : a Phase I Study. *Clinical Cancer Research*, *15*, 5584-5590.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., et al. (2007). Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer : A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(15), 1960-1966.
- Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., Gress, T., et al. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/ Smad4. *Virchows Arch*, *439*, 798-802.
- Morgan, R., Woods, L., Moore, G., Quinn, L., McGavran, L., & Gordon, S. (1980). Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, *25*, 591-598.
- Mori, E., Thomas, M., Motoki, K., Nakazawa, K., Tahara, T., Tomizuka, K., Ishida, I., et al. (2004). Human normal hepatocytes are susceptible to apoptosis signal mediated by both TRAIL-R1 and TRAIL-R2. *Cell Death and Differentiation*, *11*, 203-207.
- Munshi, A., Pappas, G., Honda, T., McDonnell, T. J., Younes, A., Li, Y., & Meyn, R. E. (2001). TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2. *Oncogene*, *20*, 3757-3765.
- Mühlenbeck, F., Haas, E., Schwenzer, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., et al. (1998). TRAIL/Apo2L Activates c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) via Caspase-dependent and Caspase-independent Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(49), 33091-33098.
- Natoni, A., MacFarlane, M., Inoue, S., Walewska, R., Majid, A., Knee, D., Stover, D. R., et al. (2007). TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. *British Journal of Haematology*, *139*(October), 568-577.
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J. A., Hickey, H., Beger, H., et al. (2004). A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *350*, 1200-1210.
- Nilsen, T., & Vatten, L. (2000). A prospective study of lifestyle factors and the risk of pancreatic cancer in Nord-Trøndelag, Norway. *Cancer Causes Control*, *11*, 645-52.

- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., et al. (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JMA*, 297, 267-77.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Masashi, A., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., et al. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-9.
- Okabe, T., Yamaguchi, N., & Ohsawa, N. (1983). Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer*, 51, 662-668.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.-fei, Yu, G.-liang, Gentz, R., & Dixit, V. M. (1997). An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain – Containing Receptor for TRAIL. *Science*, 277, 815-818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., & Dixit, V. M. (1997). The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-114.
- Patel, A. V., Rodriguez, C., Bernstein, L., Chao, A., Thun, M. J., & Calle, E. E. (2005). Obesity , Recreational Physical Activity , and Risk of Pancreatic Cancer In a Large U . S . Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14, 459-466.
- Pawel, J. V., Harvey, J. H., Spigel, D. R., Dediu, M., Reck, M., Cebotaru, C. L., Humphreys, R. C., et al. (2014). Phase II Trial of Mapatumumab , a Fully Human Agonist Monoclonal Antibody to Tumor Ligand Receptor 1 (TRAIL-R1), in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 15(3), 188-196.e2.
- Paz-Ares, L, Sánchez Torres, J., Diaz-Padilla, I., Links, M., Reguart, N., & Boyer, M. (2009). Safety and efficacy of AMG 655 in combination with paclitaxel and carboplatin (PC) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*, 27, abstract e19048.
- Paz-Ares, Luis, Bálint, B., Boer, R. H. D., Meerbeeck, J. P. van, Wierzbicki, R., Souza, P. D., Galimi, F., et al. (2013). A Randomized Phase 2 Study of Paclitaxel and Carboplatin with or without Conatumumab for First-Line Treatment of Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(3), 329-337.
- Petrioli, R., Roviello, G., Fiaschi, A. I., Laera, L., Marrelli, D., Roviello, F., & Francini, E. (2015). Gemcitabine, oxaliplatin, and capecitabine (GEMOXEL) compared with gemcitabine alone in metastatic pancreatic cancer : a randomized phase II study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 75, 683-690.
- Piscuoglio, S., Zlobec, I., Pallante, P., Sepe, R., Esposito, F., Zimmermann, A., Diamantis, I., et al. (2012). HMGA1 and HMGA2 protein expression correlates with advanced tumour grade and lymph node metastasis in pancreatic adenocarcinoma. *Histopathology*, 60, 397-404.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., & Ashkenazi, A. (1996). Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand , a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family *. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(22), 12687-12690.

- Plummer, R., Attard, G., Pacey, S., Li, L., Razak, A., Perrett, R., Barrett, M., et al. (2007). Phase 1 and Pharmacokinetic Study of Lexatumumab in Patients with Advanced Cancers. *Clinical Cancer Research*, 13(20), 6187-6195.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshmann, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030 : The Unexpected Burden of Thyroid , Liver , and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, 74, 2913-2921.
- Rapp, K., Schroeder, J., Klenk, J., Stoehr, S., Ulmer, H., Concin, H., Diem, G., et al. (2005). Obesity and incidence of cancer : a large cohort study of over 145 000 adults in Austria. *British Journal of Cancer*, 93, 1062-1067.
- Reck, M., Krzakowski, M., Chmielowska, E., Sebastian, M., Hadler, D., Fox, T., Wang, Q., et al. (2013). A randomized , double-blind , placebo-controlled phase 2 study of tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin / paclitaxel in patients with chemotherapy-naive metastatic / unresectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 82(3), 441-448.
- Robert Koch-Institut. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010. Eine Gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch- Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, 9. Ausgabe* (pp. 1-150).
- Rocha Lima, C., Bayraktar, S., Flores, A., MacIntyre, J., Montero, A., & Baranda, J. (2012). Phase Ib study of drozitumab combined with first-line mFOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Invest*, 30, 727–731.
- Rossen, van M., Hofland, L., Tol, van den M., Koetsveld, van P., Jeekel, J., Marquet, R., & Eijck, van C. (2001). Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. *J Pathol.*, 193(4), 530-7.
- Roy, M. J., Vom, A., Czabotar, P. E., & Lessene, G. (2014). Cell death and the mitochondria : therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *British Journal of Pharmacology*, 171, 1973-1987.
- Röder, C., Trauzold, A., & Kalthoff, H. (2011). Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *European Journal of Cell Biology*, 90, 450-455.
- Saltz, L., Infante, J., Schwartzberg, L., Stephenson, J., Rocha-Lima, C., & Galimi, F. (2009). Safety and efficacy of AMG 655 plus modified FOLFOX6 (mFOLFOX6) and bevacizumab (B) for the first-line treatment of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 27, abstract 4079.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K.-michael, et al. (1998). Two CD95 (APO-1 / Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*, 17(6), 1675-1687.
- Schmaltz, C., Alpdogan, O., Kappel, B. J., Muriglian, S. J., Rotolo, J. A., Ongchin, J., Willis, L. M., et al. (2002). T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nature Medicine*, 8(12), 1433-1437.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.-L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., & Tschopp, J. (1998). Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is

- Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *J. Exp. Med.*, 187(8), 1205-1213.
- Seki, N., Hayakawa, Y., Brooks, A. D., Wine, J., Wiltrout, R. H., Yagita, H., Tanner, J. E., et al. (2003). Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated Apoptosis Is an Important Endogenous Mechanism for Resistance to Liver Metastases in Murine Renal Cancer. *Cancer Research*, 63, 207-213.
- Seufferlein, T., Porzner, M., Becker, T., Budach, V., Ceyhan, G., Esposito, I., Fietkau, R., et al. (2013). *S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom S3-Guideline Exocrine Pancreatic Cancer* (pp. 1395-1440).
- Sharma, S., Vries, E. G. D., Infante, J. R., Oldenhuis, C. N., Gietema, J. A., Yang, L., Bilic, S., et al. (2014). Safety , pharmacokinetics , and pharmacodynamics of the DR5 antibody LBY135 alone and in combination with capecitabine in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 32, 135-144.
- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., et al. (1997). Control of TRAIL-Induced Apoptosis by a Family of Signaling and Decoy Receptors. *Science*, 277, 818-821.
- Siegmund, D., Klose, S., Zhou, D., Baumann, B., Röder, C., Kalthoff, H., Wajant, H., et al. (2007). Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cellular Signalling*, 19, 1172-1184.
- Sikic, B., Wakelee, H., von Mehren, M., Lewis, N., Calvert, A., & Plummer, E. (2007). A phase Ib study to assess the safety of lexatumumab, a human monoclonal antibody that activates TRAIL-R2, in combination with gemcitabine, pemetrexed, doxorubicin or FOLFIRI. *Journal of Clinical Oncology*, 25, 18S 14006.
- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., & Klöppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines : towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch*, 442, 444-452.
- Smith, C. A., Farrah, T., & Goodwin, R. (1994). The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins : Activation , & stimulation , and Death. *Cell*, 76, 959-962.
- Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., Brink, M. R. M. V. D., & Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL — On a Path to Cancer Immunotherapy. *Immunity*, 18(3), 1-6.
- Sohn, T., Yeo, C., Cameron, J., Koniaris, L., Kaushal, S., Abrams, R., Sauter, P., et al. (2000). Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg.*, 4(6), 567-79.
- Soria, J.-charles, Mark, Z., Zatloukal, P., Szima, B., Albert, I., Juhasz, E., Pujol, J.-L., et al. (2011). Randomized Phase II Study of Dulanermin in Combination With Paclitaxel , Carboplatin , and Bevacizumab in Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(33), 4442-4451.
- Soria, J.-charles, Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X., Hsu, C.-pang, Reese, D., et al. (2010). Phase 1b Study of Dulanermin (recombinant human Apo2L/ TRAIL) in Combination With Paclitaxel , Carboplatin , and Bevacizumab in Patients With Advanced Non-Squamous Non – Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(9), 1527-1533.

- Spierings, D. C. J., Vries, E. G. E. D., Timens, W., Groen, H. J. M., Boezen, H. M., & Jong, S. D. (2003). Expression of TRAIL and TRAIL Death Receptors in Stage III Non-Small Cell Lung Cancer Tumors. *Clinical Cancer Research*, 9, 3397-3405.
- Sträter, J., Hinz, U., Walczak, H., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Herfarth, C., Möller, P., et al. (2002). Expression of TRAIL and TRAIL Receptors in Colon Carcinoma: TRAIL-R1 Is an Independent Prognostic Parameter. *Clinical Cancer Research*, 8(December), 3734-3740.
- Talamini G, Bassi C, Falconi, M., Sartori, N., Salvia, R., Rigo, L., Castagnini, A., Di Francesco, V., Frulloni, L., et al. (1999). Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*, 44, 1303-11.
- Tepel, J., Kruse, M.-L., Kapischke, M., Haye, S., Sipos, B., Kremer, B., & Kalthoff, H. (2006). Adjuvant Treatment of Pancreatic Carcinoma in a Clinically Adapted Mouse Resection Model. *Pancreatology*, 6, 240-247.
- Tolcher, A. W., Mita, M., Meropol, N. J., Mehren, M. V., Patnaik, A., Padavic, K., Hill, M., et al. (2007). Phase I Pharmacokinetic and Biologic Correlative Study of Mapatumumab , a Fully Human Monoclonal Antibody With Agonist Activity to Tumor Necrosis Factor – Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor-1. *Journal of Clinical Oncology*, 25(11), 1390-1395.
- Trarbach, T., Moehler, M., Heinemann, V., Köhne, C.-H., Przyborek, M., Schulz, C., Sneller, V., et al. (2010). Phase II trial of mapatumumab , a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 102, 506-512.
- Trauzold, A, Schmiedel, S., Röder, C., Tams, C., Christgen, M., Oestern, S., Arlt, A., et al. (2003). Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 89, 1714-1721.
- Trauzold, A, Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., & Emme, D. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 25, 7434-7439.
- Trauzold, Anna, Wermann, H., Arlt, A., Schu, S., Scha, H., Oestern, S., Ro, C., et al. (2001). CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-κB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 20, 4258-4269.
- Trebing, J., El-Mesery, M., Schäfer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., Silence, K., & Wajant, H. (2014). CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death and Disease*, 5, 1-12.
- Tuettenberg, J., Seiz, M., Debatin, K.-michael, Hollburg, W., Staden, M. von, Thiemann, M., Hareng, B., et al. (2012). Pharmacokinetics , pharmacodynamics , safety and tolerability of APG101 , a CD95-Fc fusion protein , in healthy volunteers and two glioma patients. *International Immunopharmacology*, 13(1), 93-100.
- Tuthill, M. H., Montinaro, A., Zinngrebe, J., Prieske, K., Draber, P., Prieske, S., Karstedt, S. V., et al. (2015). TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells. *Oncogene*, 34(16), 2138-2144.

- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(10), 700-715.
- Villeneuve, P., Johnson, K., Mao, Y., & Hanley, A. (2004). Environmental tobacco smoke and the risk of pancreatic cancer: findings from a Canadian population-based case-control study. *Can J Public Health*, 95, 32-37.
- Voigt, S., Philipp, S., Davarnia, P., Winoto-morbach, S., Röder, C., Arenz, C., Trauzold, A., et al. (2014). TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. *BMC Cancer*, 14, 1-14.
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Büchler, M. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Surgery*, 91, 586-594.
- Wainberg, Z. A., Messersmith, W. A., Peddi, P. F., Kapp, A. V., Ashkenazi, A., Royer-Joo, S., Portera, C. C., et al. (2013). A Phase 1B Study of Dulanermin in Combination With Modified FOLFOX6 Plus Bevacizumab in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 12(4), 248-254.
- Wajant, H., Gerspach, J., & Pfizenmaier, K. (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Letters*, 332(2), 163-174.
- Wajant, H., Haas, E., Schwenzler, R., Mühlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., et al. (2000). Inhibition of Death Receptor-mediated Gene Induction by a Cycloheximide-sensitive Factor Occurs at the Level of or Upstream of Fas-associated Death Domain Protein (FADD). *The Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24357-24366.
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wüest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schönherr, U., Peters, N., et al. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*, 20, 4101-4106.
- Wakelee, H. A., Patnaik, A., Sikic, B. I., Mita, M., Fox, N. L., Miceli, R., Ullrich, S. J., et al. (2010). Phase I and pharmacokinetic study of lexatumumab (HGS-ETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology*, 21, 376-381.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., et al. (1997). TRAIL-R2 : a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO Journal*, 16(17), 5386-5397.
- Walczak, H., Miller, R. E., Arial, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Medicine*, 5(2), 157-163.
- Wang, H., Davis, J. S., & Wu, X. (2014). Immunoglobulin Fc Domain Fusion to TRAIL Significantly Prolongs Its Plasma Half-Life and Enhances Its Antitumor Activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, (14), 643-651.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, (214), 2922-2933.
- Wick, W., Fricke, H., Junge, K., Kobayakov, G., Martens, T., Heese, O., Wiestler, B., et al. (2014). A Phase II , Randomized , Study of Weekly APG101pReirradiation versus

- Reirradiation in Progressive Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 20(24), 6304-6314.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C.-P., Nicholl, J. K., Sutherland, F., et al. (1995). Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis. *Immunity*, 3, 673-682.
- Wilson, N. S., Yang, A., Yang, B., Couto, S., Stern, H., Gogineni, A., Pitti, R., et al. (2012). Proapoptotic Activation of Death Receptor 5 on Tumor Endothelial Cells Disrupts the Vasculature and Reduces Tumor Growth. *Cancer Cell*, 22, 80-90.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, R. E., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., et al. (1997). KILLER/ DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature Genetics*, 17, 141-143.
- Wu, G. S., Burns, T. F., Zhan, Y., Alnemri, E. S., & El-Deiry, W. S. (1999). Molecular Cloning and Functional Analysis of the Mouse Homologue of the KILLER / DR5 Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Death Receptor. *Cancer Research*, 59, 2770-2775.
- Yada, A., Yazawa, M., Ishida, S., Yoshida, H., Ichikawa, K., Kurakata, S., & Fujiwara, K. (2008). A novel humanized anti-human death receptor 5 antibody CS-1008 induces apoptosis in tumor cells without toxicity in hepatocytes. *Annals of Oncology*, 19(February), 1060-1067.
- Ye, W., Lagergren, J., Weiderpass, E., Nyrén, O., Adami, H.-O., & Ekblom, A. (2002). Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut*, 51, 236-239.
- Yee, L., Burris, H., Kozloff, M., Wainberg, Z., Pao, M., & Skettino, S. (2009). Phase Ib study of recombinant human Apo2L/TRAIL plus irinotecan and cetuximab or FOLFIRI in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *Preliminary results. Journal of Clinical Oncology*, 27, abstract 4129.
- Yee, L., Fanale, M., Dimick, K., Calvert, S., Robins, C., & Ing, J. (2007). A phase IB safety and pharmacokinetic (PK) study of recombinant human Apo2L/TRAIL in combination with rituximab in patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25, abstract 8078.
- Yip, D., Karapetis, C., Strickland, A., Steer, C. B., & Goldstein, D. (2006). Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev.*, 19, CD002093.
- Younes, A., Vose, J. M., Zelenetz, A. D., Smith, M., Burris, H. A., Ansell, S. M., Klein, J., et al. (2010). A Phase 1b / 2 trial of mapatumumab in patients with relapsed / refractory non-Hodgkin ' s lymphoma. *British Journal of Cancer*, 103(12), 1783-1787.
- Zhang, X. D., Zhang, X. Y., Gray, C. P., Nguyen, T., & Hersey, P. (2001). Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis of Human Melanoma Is Regulated by Smac / DIABLO Release from Mitochondria. *Cancer Research*, 61, 7339-7348.
- Özören, N., & El-Deiry, W. (2002). Defining Characteristics of Types I and II Apoptotic Cells in Response to TRAIL. *Neoplasia*, 4(6), 551-557.

7. Anhang

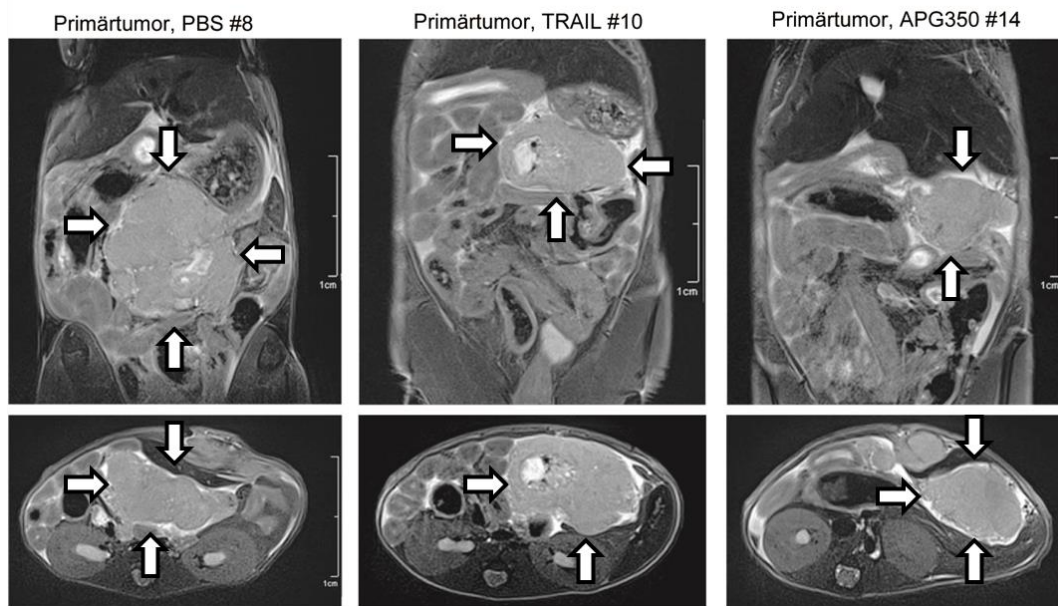


Abbildung 7.1: Effekt der konservativen Therapie mit TRAIL bzw. APG350 auf PancTul-Primärtumore.

Koronale (oben) und axiale (unten) Ansicht von MRT-Aufnahmen. Es ist ein Mausabdomen pro Behandlungsgruppe mit einem Primärtumor zu sehen. Der Scan wurde am 32. postoperativen Tag durchgeführt.

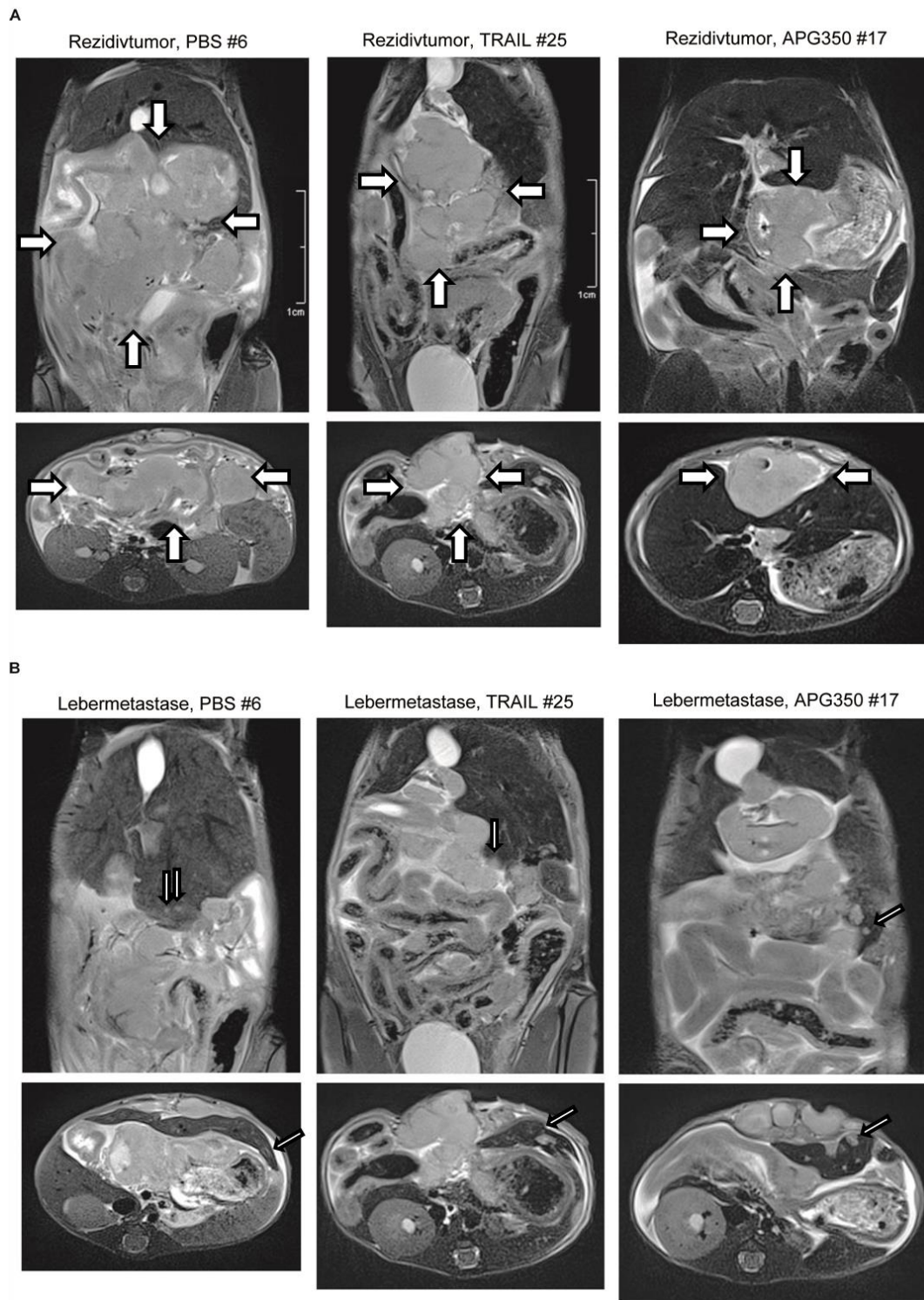


Abbildung 7.2: Effekt der adjuvanten Therapie mit TRAIL bzw. APG350 auf PancTul-Tumore und die Metastasierung.

Koronale (oben) und axiale (unten) Ansicht von MRT-Aufnahmen. Es ist ein Mausabdomen pro Behandlungsgruppe mit (A) Rezidivtumor und (B) Lebermetastasen zu sehen. Der Scan wurde am 34. postoperativen Tag durchgeführt.

8. Darstellungsverzeichnis

Abbildung 1.1: TRAIL-vermittelte Aktivierung des apoptotischen Signalweges.....	18
Abbildung 1.2: Aktivierung von nicht-apoptotischen, pro-inflammatorischen Signalwegen durch TRAIL.....	20
Abbildung 1.3: Klinischer Entwicklungsstand von TRAIL-Rezeptor-Agonisten in Phase-I und-II-Studien.....	22
Tabelle 1.1: Klinischer Entwicklungsstand der TRAIL-Rezeptor-Agonisten.....	24
Abbildung 1.4: Molekulares Design von APG350, einer neuen rekombinanten Form von TRAIL.....	26
Abbildung 2.1: Konservatives Therapieschema.....	52
Abbildung 2.2: Adjuvantes Therapieschema.....	53
Abbildung 3.1: Trimeres TRAIL und hexavalente TRAIL-Formen reduzieren die Viabilität in Colo205-Zellen.....	56
Abbildung 3.2: Vergleich der Behandlung von verschiedenen TRAIL-Formen auf PDAC-Zelllinien.....	57
Abbildung 3.3: TRAIL-Formen induzieren Apoptose in Colo357- und Panc89-Zellen...	59
Abbildung 3.4: Untersuchung der apoptotischen Wirkung von trimeren TRAIL und hexameren APG350 in PDAC-Zellen.....	60
Abbildung 3.5: Apoptotische Wirkung von TRAIL und APG350 in PDAC-Zellen.....	61
Abbildung 3.6: Expression von Bcl-xL in diversen PDAC-Zelllinien.....	62
Abbildung 3.7: Apoptotische Wirkung von trimeren TRAIL auf sensitive und resistente PDAC-Zellen.....	63
Abbildung 3.8: Einfluss der TRAIL-Formen auf die Viabilität von resistenten PDAC-Zellen.....	63
Abbildung 3.9: Bcl-xL schützt PDAC-Zellen vor TRAIL- bzw. APG350-vermittelter Apoptose.....	65
Abbildung 3.10: Untersuchung der nicht-apoptotischen Wirkung von diversen TRAIL-Formen.....	66
Abbildung 3.11: Proinflammatorische Wirkung von TRAIL und APG350 auf Colo357-Zellen.....	67
Abbildung 3.12: Einfluss von Bcl-xL auf die Behandlung von resistenten PDAC-Zellen.....	68
Abbildung 3.13: Untersuchung der nicht-apoptotischen Wirkung von verschiedenen TRAIL-Formen auf PDAC-Zellen.....	69
Abbildung 3.14: Trimeres TRAIL bzw. hexameres APG350 induzieren IL-8 in PDAC-Zellen.....	70
Abbildung 3.15: Beide TRAIL-Formen induzieren verstärkt IL-8 in den Colo357 Bcl-xL-Zellen.....	71
Abbildung 3.16: Übersicht des Tierversuchs mit der Zelllinie PancTul in der konservativen Therapie.....	72
Abbildung 3.17: Bestimmung des Serumspiegels von TRAIL und APG350 im Mausblut.....	73
Abbildung 3.18: Effekt der konservativen Therapie von APG350 bzw. TRAIL auf PancTul-Tumore.....	74
Abbildung 3.19: Einfluss der konservativen Therapie mit APG350 bzw. TRAIL auf die	

Proliferation und Angiogenese der PancTul-Tumore.....	75
Abbildung 3.20: Übersicht der Tierversuche mit der Zelllinie Colo357-Vektor und der Zelllinie Colo357 Bcl-xL in der konservativen Therapie.....	76
Abbildung 3.21: Bestimmung des Serumspiegels von TRAIL und APG350 im Mausblut an zwei Zeitpunkten.....	77
Abbildung 3.22: Repräsentative Bilder der Tumor-Sonographie des konservativen Therapieansatzes.....	79
Abbildung 3.23: Einfluss der konservativen Therapie von APG350 bzw. TRAIL auf das Wachstum von sensitiven und resistenten PDAC-Tumoren.....	80
Abbildung 3.24: Bcl-xL-Expression in Colo357-Vektor- und Colo357 Bcl-xL-Tumoren.....	81
Abbildung 3.25: Einfluss der konservativen Therapie von TRAIL bzw. APG350 auf die Proliferation.....	83
Abbildung 3.26: Wirkung der konservativen TRAIL- bzw. APG350-Therapie auf die Lebermetastasierung.....	84
Abbildung 3.27: Übersicht des Tierversuchs mit der Zelllinie PancTul in der adjuvanten Therapie.....	85
Abbildung 3.28: Adjuvante Therapie mit TRAIL oder APG350 reduziert signifikant das Gewicht der PancTul-Rezidivtumore.....	86
Abbildung 3.29: Adjuvante Therapie führt zu keiner Veränderung der Proliferationsrate Ki67 in PancTul-Rezidivtumoren.....	87
Abbildung 3.30: TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 positive Zellen in PancTul-Tumoren.....	87
Abbildung 3.31: Immunhistochemische Färbungen an behandelten PancTul-Rezidivtumoren.....	88
Abbildung 3.32: Übersicht der Tierversuche mit den Zelllinien Colo357-Vektor und Colo357 Bcl-xL in der adjuvanten Therapie.....	89
Abbildung 3.33: Wirkung der adjuvanten Therapie mit TRAIL bzw. APG350 auf sensitive und resistente PDAC-Tumore.....	90
Abbildung 3.34: Expression von Bcl-xL in sensitiven und resistenten PDAC-Tumoren.....	91
Abbildung 3.35: Wirkung der adjuvanten TRAIL- bzw. APG350-Therapie auf die Lebermetastasierung.....	92
Abbildung 7.1: Effekt der konservativen Therapie mit TRAIL bzw. APG350 auf PancTul-Primärtumore.....	120
Abbildung 7.2: Effekt der adjuvanten Therapie mit TRAIL bzw. APG350 auf PancTul-Tumore und die Metastasierung.....	121

9. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Anna Trauzold und bei dem – ehemaligen – Institutsleiter Prof. Dr. Holger Kalthoff dafür, dass ich meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Ich habe die wissenschaftlichen Ratschläge und fachlichen Diskussionen sehr geschätzt.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Thomas Roeder für Ihre Bereitschaft diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Charlotte Hauser für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie die wertvollen Ratschläge. Ich schätze Deine Offenheit und Ehrlichkeit und bin sehr stolz, Dich als meine Freundin gewonnen zu haben.

Prof. Dr. Jan-Hendrik Egberts danke ich sehr für die Durchführung der tierexperimentellen Operationen und die wertvollen Ratschläge.

Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. Carola Heneweer und Susan Jünger für die Durchführung der Kleintiersonographie sowie Prof. Dr. Susan Boretius und Kristin Kötz für die Durchführung der MRT-Scans.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Gökhan Alp und Dr. Sebastian Hübner für die Unterstützung im Labor bedanken. Bianca Zinke, Tina Jansen und Michaela Schwarz danke ich für die Hilfe bei der Transfektion der Zellen und bei der Aufarbeitung des Tumormaterials.

Aus dem Institut für Pathologie bedanke ich mich bei Sandra Krüger und Marten Rönckendorf für die Hilfestellung bei den immunhistochemischen Färbungen.

Dr. Christian Röder danke ich für seine fachliche Kompetenz zur Methodik und zur Datenauswertung.

Meinen Büromitbewohnern Dr. Hendrik Braun, Hella Schittek, Angela Zaccagnino, Dr. Doaa El-Sheik und David Radke danke ich für die schöne Zeit sowohl im Labor als auch im Büro.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Tumorforschung sowie den Mitarbeitern des MOIN-CC gebührt mein Dank; denn jeder hat seinen Teil dazu beigetragen, meine Promotionszeit erfolgreich und für mich unvergesslich werden zu lassen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Benno und Olaf für ihre grenzenlose Unterstützung während der gesamten Kieler Zeit. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

10. Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name	Karen Legler
Anschrift	Heukoppel 44, 22179 Hamburg
Geburtsdatum	25. Juli 1986
Geburtsort	Schwerin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

SCHUL- UND UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG

09/ 2009 - 09/ 2011	Master-Studium „Molecular and Cellular Biology“ an der Philipps-Universität Marburg Abschluss: Master of Science Titel der Masterarbeit: „Die funktionelle Charakterisierung von Adiponectin im Hypothalamus bei der Entstehung von Diabetes Typ 2“, unter der Leitung von Dr. Alexander Tups
09/ 2006 - 07/ 2009	Bachelor-Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg Abschluss: Bachelor of Science Titel der Bachelorarbeit: „Metabolische Anpassung an verschiedene Umgebungstemperaturen und Nahrungsbedingungen sowie Vergleich isolierter Mitochondrien bei <i>Acomys russatus</i> “, unter der Leitung von Prof. Dr. Gerhard Heldmaier
08/ 1999 - 06/ 2006	Johann-Wolfgang-von-Goethe-Gymnasium in Pritzwalk Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/ 1993 - 07/ 1999	Grundschule-Nord in Pritzwalk

PROMOTIONSARBEIT

12/ 2011 - 03/2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Sektion für Molekulare Onkologie, Institut für Experimentelle Tumorforschung, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Titel der Arbeit: „ <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen der Wirkung eines neuen rekombinanten TRAIL-Rezeptor Agonisten auf Pankreasadenokarzinomzellen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Kalthoff und Prof. Dr. Anna Trauzold
--------------------	--

11. Publikationen

ORIGINALARBEITEN

Koch CE, Ganjam G, Steger J, **Legler K**, Stöhr S, Schumacher D, Hoggard N, Heldmaier G, Tups A. (2012) The dietary flavonoids naringenin and quercetin acutely impair glucose metabolism in rodents possibly via inhibition of hypothalamic insulin signalling. *Br J Nutr.* 109(6):1040-51

Grimpo K, **Legler K**, Heldmaier G, Exner C. (2013) That's hot: golden spiny mice display torpor even at high ambient temperatures. *J Comp Physiol B.* 183(4):567-81

Benzler J, Ganjam GK, **Legler K**, Stöhr S, Krüger M, Steger J, Tups A. (2013) Acute inhibition of central c-Jun N-terminal kinase restores hypothalamic insulin signalling and alleviates glucose intolerance in diabetic mice. *J Neuroendocrinol* 25(5):446-54

Koch CE, Lowe C, **Legler K**, Benzler J, Boucsein A, Böttiger G, Grattan DR, Williams LM, Tups A. (2014) Central Adiponectin Acutely Improves Glucose Tolerance in Male Mice. *Endocrinology.* 155(5):1806-16

Goumas FA, Holmer R, Egberts JH, Gontarewicz A, Heneweer C, Geisen U, Hauser C, Mende MM, **Legler K**, Röcken C, Becker T, Waetzig GH, Rose-John S, Kalthoff H. (2015) Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 137(5):1035-46

Benzler J, Ganjam GK, Pretz D, Oelkrug R, Koch CE, **Legler K**, Stöhr S, Culmsee C, Williams LM, Tups A. (2015) Central inhibition of IKK β /NF- κ B signalling attenuates high fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Diabetes.* 64(6):2015-27

von Karstedt S, Conti A, Nobis M, Montinaro A, Hartwig T, Lemke J, **Legler K**, Annewanter F, Campbell AD, Taraborrelli L, Grosse-Wilde A, Coy JF, El-Bahrawy MA, Bergmann F, Koschny R, Werner J, Ganten TM, Schweiger T, Hoetzenecker K, Kenessey I, Hegedüs B, Bergmann M, Hauser C, Egberts JH, Becker T, Röcken C, Kalthoff H, Trauzold A, Anderson K, Sansom OJ, Walczak H. (2015) Cancer Cell-Autonomous TRAIL-R Signaling Promotes KRAS-Driven Cancer Progression, Invasion, and Metastasis. *Cancer Cell.* 27(4):561-73

POSTERPRÄSENTATIONEN

Legler K, Hauser C, Heneweer C, Goumas F, Egberts JH, Boretius S, Glüer CC, Kalthoff H, Trauzold A. (2014) Effects of TRAIL on recurrent PDAC tumor growth and metastasis. MOIN CC Symposium, Kiel, 31. Oktober - 01. November 2014

Legler K, Hauser C, Heneweer C, Goumas F, Egberts JH, Boretius S, Glüer CC, Kalthoff H, Trauzold A. (2014) Effects of TRAIL on recurrent PDAC tumor growth and metastasis. 18th Joint Meeting Signal Transduction Society (STS), Weimar, 05. - 07. November 2014

POSTERBEITRÄGE

Linder B, Hauser C, Manago A, **Legler K**, Egberts JH, Szabo I, Kalthoff H, Tepel J. (2014) Kv1.3-Inhibitoren als neues Target in der Therapie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas im präklinischen Modell. 193. Sommertagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Bremen, 19. - 21. Juni 2014

Tiwari S, Zhou X, Hauser C, **Legler K**, Damm J, Egberts JH, Glüer CC, Boretius S, Kalthoff H. (2015) In vivo near-infrared fluorescent imaging of pancreatic tumor in mice using a novel antibody to CEACAM-5. European Molecular Imaging Meeting 2015, Tübingen, 18. - 20. März 2015

Gundlach JP, Annewanter F, **Legler K**, Hauser C, Tawfik D, Egberts JH, Sebens S, Becker T, Kalthoff H, Trauzold A. (2015) TRAIL-R4 enhances the malignancy of pancreatic tumor cells. 19th Joint Meeting Signal Transduction Society (STS), Weimar, 02. - 04. November 2015

MITWIRKUNG AN VORTRÄGEN

Hauser C, **Legler K**, Goumas F, Kalthoff H, Trauzold A, Egberts JH. (2014) Die vielseitige Wirkung des Todesliganden TRAIL auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas. Günther-Haenisch-Forschungs- und Studienstiftungspreis, 194. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Hamburg, 27. - 29. November 2014

Hauser C, **Legler K**, Heneweer C, Goumas F, El-Sheikh D, Egberts JH, Becker T, Kalthoff H, Trauzold A. (2015) Inhibition of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 – a novel promising strategy for treatment of PDAC. 132. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 28. April - 01. Mai 2015

12. Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „ *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen der Wirkung eines neuen rekombinanten TRAIL-Rezeptor-Agonisten auf Pankreasadenokarzinomzellen“ abgesehen von der Beratung durch die Betreuerin nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist und ich keine anderen Hilfsmittel als die angegeben verwendet habe. Die Arbeit wurde weder ganz noch zum Teil einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und bisher nicht veröffentlicht. Die Forschungsarbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 2017

.....

Karen Legler