Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kombinationseffekte von TRAIL und Retinoiden an Zellkulturmodellen des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annekathrin Kratz

aus Lutherstadt Wittenberg

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Ab	strakt	1
2	Ein	nleitung	5
	2.1	Mammakarzinom	5
	2.2	Osteosarkom	6
	2.3	TRAIL	7
		2.3.1 Physiologische Funktion	7
		2.3.2 Mechanismen der <i>TRAIL</i> -vermittelten Apoptose-Induktion in Tumorzellen	7
		2.3.3 Mechanismen verminderter Tumorzell-Sensitivität gegenüber TRAIL	9
		2.3.4 Strategien der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber <i>TRAIL</i> - induzierter Apoptose	10
		2.3.5 TRAIL-vermittelte Effekte beim Mammakarzinom	11
		2.3.6 TRAIL-vermittelte Effekte beim Osteosarkom	12
		2.3.7 Klinische Relevanz im Rahmen der Tumortherapie	13
	2.4	Retinoide	14
		2.4.1 Retinoid-Rezeptoren und deren Liganden	15
		2.4.2 Retinoid-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in Tumorzellen	15
		2.4.3 Retinoid-vermittelte Effekte beim Mammakarzinom	16
		2.4.4 Retinoid-vermittelte Effekte beim Osteosarkom	17
		2.4.5 Klinische Relevanz im Rahmen der Tumortherapie	18
	2.5	Grenzen aktueller Standards der systemischen Therapie des	
		Mammakarzinoms und des Osteosarkoms – Nutzen einer Kombination von TRAIL mit Retinoiden	20
	2.6	Herleitung der Fragestellung	22
3	Me	thodik	25
	3.1	Materialien zur Versuchsdurchführung	25

	3.1.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	25
	3.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
	3.1.3 Substanzen, Medien und Chemikalien	26
	3.1.4 Puffer, Lösungen und Gele	28
	3.1.5 Antikörper	30
	3.1.6 Handelsübliche Reaktions-Kits	31
	3.1.7 Software zur Datenauswertung und -modellierung	31
3.2	Zelllinien und Zellkultur	32
	3.2.1 Charakteristika und Herkunft der Zellen	32
	3.2.2 Zellkultivierung	33
	3.2.3 Langfristige Aufbewahrung von Aliqouts	33
3.3	MTT-Test – Bestimmung der Zellviabilität	33
	3.3.1 Prinzip	33
	3.3.2 Durchführung	34
3.4	Clonogenic Assay – Untersuchung der Kolonieformationspotenz von	
	Einzelzellen	35
	3.4.1 Prinzip	35
	3.4.2 Durchführung	35
3.5	TUNEL-Assay – Nachweis der Fragmentierung nukleärer DNA	36
	3.5.1 Prinzip	36
	3.5.2 Durchführung	36
3.6	Cell Death Detection ELISAPLUS – Nachweis von Nukleosomen im	
	Zytoplasma	
	3.6.1 Prinzip	37
	3.6.2 Durchführung	37
3.7	Western Blot	38
	3.7.1 Prinzip	38
	3.7.2 Durchführung	39

	3.8	Caspase-Activity-Assay	41
		3.8.1 Prinzip	41
		3.8.2 Durchführung	41
	3.9	Statistische Auswertung	42
4	Erg	gebnisse	43
	4.1	Abhängigkeit der Tumorzell-Responsivität gegenüber TRAIL und	
		Retinoiden von Morphologie und Dignität der jeweiligen Zelllinie	43
	4.2	Zelltyp-spezifischer Synergismus von <i>TRAIL</i> und Retinoiden in der Reduktion der Zellviabilität	46
	4.3	Der <i>TRAIL</i> - und Retinoid-vermittelten Inhibition der Tumorzellproliferation können sowohl zytostatische als auch zytotoxische Mechanismen zugrunde liegen	51
	4.4	Die <i>TRAIL</i> - und Retinoid-vermittelte Proliferationsinhibition korreliert mit dem Grad der <i>DNA</i> -Fragmentierung in SK-BR-3-Zellen	53
	4.5	Die Inkubation von SK-BR-3- und Saos-2-Zellen mit Retinoiden korreliert mit der Spaltung der <i>Procaspasen</i> 3 und 9	56
	4.6	TRAIL- und Retinoid-vermittelte Aktivitäten der Caspasen 3, 8 und 9 sind jeweils Zelltyp-spezifisch	58
	4.7	Pan-Caspase-Inhibition korreliert mit einer Erhöhung der Viabilität TRAIL- sowie kombiniert TRAIL- und Retinoid-behandelter Tumorzellen	60
	4.8	Regulierung der Death Receptors 4 und 5 durch TRAIL und Retinoide	63
	4.9	Regulierung anderer relevanter Komponenten der <i>TRAIL</i> -Signaltransduktion und Apoptose-Induktion	65
	4.10	Einfluss der Kombination von <i>TRAIL</i> und Retinoiden auf die Viabilität nicht-maligner Zellverbände	68
5	Dis	skussion	72
	5.1	Phänotyp-Abhängigkeit der <i>TRAIL</i> - und Retinoid-Responsivität von Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zellen	74
		5.1.1 Mesenchymale Phänotypen zeigen <i>TRAIL</i> -Sensitivität	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

		5.1.2 Epitheliale Phänotypen zeigen Retinoid-Sensitivität
		5.1.3 Relevanz der <i>HER2</i> -Überexpression
	5.2	Kombinationseffekte von <i>TRAIL</i> und Retinoiden auf die Vitalität von Mammakarzinom- und Osteosarkomzellen
		5.2.1 Kombinationseffekte an Zelllinien mesenchymalen Phänotyps 86
		5.2.2 Kombinationseffekte an Zelllinien epithelialen Phänotyps
	5.3	Rolle von <i>Caspasen</i> , <i>Bcl-2</i> -Proteinen, Inhibitors of Apoptosis und <i>FLIP</i> im Rahmen der <i>TRAIL</i> - und Retinoid-vermittelten Signaltransduktion 89
		5.3.1 Die synergistische Apoptose-Induktion in Saos-2-Zellen korrelierte mit einer Steigerung der <i>Caspase</i> -3-Aktivierung
		5.3.2 Die <i>TRAIL</i> - und <i>atRA</i> -vermittelte Apoptose-Induktion in SK-BR-3-Zellen ist <i>Caspase</i> -reguliert
		5.3.3 Alterationen von Bcl-2-Proteinen, Inhibitors of Apoptosis und FLIP 92
	5.4	Rolle der <i>Death Receptors</i> im der Rahmen <i>TRAIL</i> - und Retinoid- vermittelten Signaltransduktion
	5.5	Tumorselektivität der TRAIL- und Retinoid-induzierten Apoptose
6	Lite	eraturverzeichnis99
7	Eid	lesstattliche Versicherung109
8	Lek	penslauf110
9	Dai	nksagung111

Abkürzungsverzeichnis

9cisRA	9-cis-Retinoic acid
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
Apo2L	Apo-2 ligand
APS	Ammoniumpersulfat
atRA	All-trans-Retinoic acid
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, tBid	BH3-interacting domain death agonist, truncated BH3-interacting domain
	death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-directed protease
CI	Kombinations-Index
cIAP1/2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DIN	Ductale intraepitheliale Neoplasie
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DR	Death receptor
ERα	Estrogen-Rezeptor α
FADD	Fas-associated death domain
FCS	Fetal calf serum
FLICE	FADD-like interleukin converting enzyme
FLIP	FLICE inhibitory protein
HAT	Histon-Acetyltransferase
HER2	Human Epithelial Growth Factor Receptor 2
<i>IC</i> ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulin-like growth factor I
LIT	Lymphocyte inhibitor of TRAIL
McI-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEGM	Mammary Epithelial Cell Growth Medium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	Options Dights
	Optische Dichte

PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	PBS + 0,05% (v/v) Tween 20
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RAR	Retinoic acid receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RXR	Retinoid X receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily
TNFSF10	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor
TRID	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without
	an intracellular domain
TRUNDD	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with
	truncated death domain
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end
	labeling
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

1 Abstrakt

Zusammenfassung

Mit einer aktuellen Lebenszeitprävalenz von 12,5% ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der weiblichen Bevölkerung Deutschlands [8]. Aufgrund der sich häufig im Therapieverlauf entwickelnden oder habituellen Pharmakoresistenz jener Tumorentität besteht die Notwendigkeit zur Exploration alternativer, gezielter Wirkmechanismen und Therapieansätze [12, 128].

Trotz seiner Zugehörigkeit zur Kategorie der seltenen malignen Neoplasien ist das Osteosarkom der häufigste Knochentumor im Kindes- und Jugendalter. Da sich die Prognose der sogenannten poor responders sowie des metastasierten Osteosarkoms als besonders ungünstig erweist, ist die Etablierung weiterer wirksamer und tumorselektiver Therapieansätze auch für diese Entität von klinischer Relevanz [8, 14, 129-133].

Für rhTRAIL, einen Vertreter der TNF-Proteinfamilie, der über Ligandierung von Transmembranrezeptoren Apoptose-Prozesse initiiert, ist am in-vitro- sowie am Mausmodell eine Neoplasie-spezifische bei geleichzeitig geringer systemischer Toxizität bereits nachgewiesen worden [21, 151].

Retinoide fungieren über die Bindung nukleärer Hormonrezeptoren, die wiederum als Liganden-aktivierbare Transkriptionsfaktoren mit Response-Elementen distinkter Gene assoziieren, als Regulatoren Proliferations- und Apoptose-relevanter Signaltransduktionskomponenten [6, 7, 74, 84].

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung und Charakterisierung Tumorzellinhibierender Wirkungen einer Kombination von TRAIL und Retinoiden am in-vitro-Modell des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass von den angewandten Tumorzelllinien alle mesenchymalen Phänotypen hohe TRAIL- und geringe Retinoid-Suszeptibilitäten aufwiesen. Ein Großteil der epithelialen Kulturen hingegen verhielt sich TRAIL-resistent. Zudem zeigten Zelllinien hoher Retinoid-Responsivität sämtlich epitheliale Morphologien. Die simultane Inkubation mit TRAIL und atRA bzw. 9cisRA resultierte in

einer synergistischen Proliferationsinhibition, der sowohl zytostatische als auch zytotoxische Mechanismen zugrunde lagen.

Entsprechend korrelierte der an Mammakarzinom-Zellkulturen vom Typ SK-BR-3 beobachtete Kombinationseffekt mit einer Augmentation der Fragmentierung nukleärer DNA sowie mit einer Hochregulation der TRAIL-Rezeptor-Expression. An Saos-2-Osteosarkom-Zellen ging jener Synergismus mit einer Steigerung der Caspase-3-Aktivierung einher. Da an beiden Kulturmodellen die Inhibition von Caspasen in einer Diminution der Kombinations-vermittelten Zellviabilitäts-Reduktion resultierte, ist festzuhalten, dass der TRAIL- und Retinoid-vermittelten Tumorzelltoxizität mitunter die Aktivierung von Caspasen und demnach eine Induktion von Apoptose zugrunde liegt. Zudem waren an SK-BR-3-Zellen TRAIL- bzw. atRA-induzierte Alterationen der Bcl-2-Proteine tBid, Bak, Mcl-1 und Bcl-2 sowie des Inhibitor-of-Apoptosis-Proteins Survivin detektierbar.

Während die kombinierte Exposition der genannten Tumorzell-Modelle gegenüber TRAIL und Retinoiden mit einer synergistischen Proliferationsinhibition assoziiert war, wiesen primäre Osteoblasten sowie mammäre Epithelzellen selbst bei Applikation verhältnismäßig hoher Konzentrationen allenfalls geringe Suszeptibilitäten auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen demnach das Potenzial einer Malignom-selektiven zytotoxischen und zytostatischen Wirksamkeit des untersuchten Kombinationskonzepts und geben Anlass zur Evaluation seiner klinischen Anwendbarkeit als zielgerichtete und nebenwirkungsarme Alternative zur aktuellen Pharmakotherapie des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms.

Abstract

With a lifetime prevalence of 12.5%, breast cancer is the most common malignancy in women. The frequent occurrence of habitual or in the clinical course establishing pharmacoresistances implicates the necessity of exploring further mechanisms of action.

Despite of being a rare neoplasm in the general population, osteosarcoma is the most frequent bone tumour in children and adolescents. Due to the dismal prognosis of especially poor responders and patients with metastatic disease, exploration of alternative, effective and tumour selective pharmacotherapies is clinically relevant.

For rhTRAIL, a member of the TNF protein family that induces apoptosis via ligation of cell surface receptors, malignancy-specific and low systemic toxicity has already been verified.

By binding nuclear hormone receptors that in turn fungate as ligand-activated transcription factors, retinoids act as regulators of signal transduction components directing proliferation and apoptosis.

The present work focuses on analysing and characterizing tumour cell-inhibiting effects of a TRAIL and retinoid combination on breast cancer and osteosarcoma cell culture models.

The outlined results indicate that from the applied tumour cell lines, all mesenchymal phenotypes exhibited high TRAIL and low retinoid susceptibility, whereas the bulk of epithelial cell cultures was TRAIL-resistant. In addition, all highly retinoid-sensitive cell lines had epithelial morphologies. The simultaneous incubation with TRAIL and atRA or 9cisRA resulted in a synergistic inhibition of proliferation based on cytostatic and cytotoxic mechanisms. In SK-BR-3 breast cancer cells, the combination effect correlated with augmented fragmentation of nuclear DNA and TRAIL receptor upregulation. In Saos-2 osteosarcoma cultures, the synergism was associated with elevated activation of caspase 3. The diminution of antiproliferative combination effects on both in-vitro-models by inhibition of caspases implicates, that the TRAIL- and retinoid-induced tumour cell toxicity may – at least in part – result from caspase activation and thus, induction of apoptosis.

Moreover, TRAIL- and atRA-treated SK-BR-3 cells showed alterations of the Bcl-2 proteins tBid, Bak, Mcl-1 and Bcl-2 as well as of the inhibitor of apoptosis protein Survivin.

Whereas the combined exposition of the above-named tumour cell culture models to TRAIL and retinoids lead to synergistic growth inhibition, primary osteoblasts and mammary epithelial cells showed – even at proportionally high concentrations – merely slight susceptibilities.

Hence, the results revealed by this work clearly confirm the tumour-selective cytostatic and cytotoxic effects of a TRAIL and retinoid combination scheme and give rise to its evaluation as a targeted and adverse event-depleted alternative to actual treatment algorithms in breast cancer and osteosarcoma pharmacotherapy.

2 Einleitung

Bereits seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts bilden Chemotherapie und/oder *Radiatio* fundamentale Komponenten standardisierter Behandlungsalgorithmen maligner Neoplasien [1]. Im Jahre 1972 fand erstmals das Phänomen der Apoptose – des programmierten Zellsterbens – als grundlegender Mechanismus jener Therapieverfahren Erwähnung [2, 3].

Aus der überwiegenden Abhängigkeit der Wirksamkeit zytostatischer und radiotherapeutischer Ansätze von der Zellproliferationsrate ergibt sich hierbei das Dilemma einer mangelnden Diskrimination zwischen malignen und nicht-malignen Zellverbänden. Die im Rahmen jener Tumortherapien auftretende zytotoxische Affektion gesunder Gewebe mit hohen Zellumsatzraten, die in der klinischen Praxis für einen Großteil der Nebenwirkungen verantwortlich ist, stellt einen der Anlässe zur Etablierung alternativer, sowohl tumorselektiver als auch nebenwirkungsärmerer Behandlungsansätze dar [1]. Als potenzielle Therapeutika, die bei nachgewiesener (Tumor-)Zell-Spezifität ihrer antiproliferativen sowie proapoptotischen Effekte und begrenzter systemischer Zytotoxizität jene anzustrebenden pharmakologischen Anforderungen erfüllen, sollen im Folgenden die Retinoide 9cisRA und atRA sowie der TNFR-Ligand TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand) an in-vitro-Modellen des Mammakarzinoms und Osteosarkoms untersucht und diskutiert werden [4-7].

2.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist laut Angaben der Deutschen Krebsgesellschaft und des Statistischen Bundesamtes mit einem Anteil von ca. 27-31% aller Malignome die häufigste Krebserkrankung der Frau und war im Jahre 2011 die vierthäufigste Todesursache der weiblichen Bevölkerung Deutschlands [8, 9]. Auf der Grundlage aktueller epidemiologischer Berechnungen des Zentrums für Krebsregisterdaten beträgt die derzeitige Lebenszeitprävalenz des Mammakarzinoms – bezogen auf alle in Deutschland lebenden Frauen – ca. 12,5%. Hierbei weisen Patientinnen innerhalb der 70. Lebensdekade die höchste Inzidenz auf [8, 10]. Das malignom-spezifische 5-Jahres-Überleben, das je nach Erhebung zwischen 86% und 90% liegt, ist sowohl von prognostischen Faktoren als auch von der Responsivität der Neoplasie auf die

systemische Therapie abhängig [11]. Diese kann zytotoxische, endokrine und immunmodulatorische Konzepte beinhalten. Entscheidenden Einfluss auf Prognose bzw. Therapieerfolg des lokalisierten Mammakarzinoms haben hierbei neben Lymphknotenbefall, Tumorgröße und histologischem Grading auch der Hormonrezeptor- sowie der HER2-Status. Zum Beispiel haben Hormonrezeptorexprimierende Mammakarzinome, die bei Erstdiagnose einen Anteil von etwa 60% bis 67% einnehmen, die günstigste Prognose. Eine Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase HER2, deren codierendes Gen in 15% bis 20% aller humanen amplifiziert ist, hingegen mit mammären Malignome geht einem geringen Differenzierungsgrad, mit dem erhöhten Risiko einer Lymphknotenmetastasierung sowie mit einer kürzeren Dauer des ereignisfreien und Gesamtüberlebens einher [8, 10, 12]. Die sogenannten triple-negativen Tumoren, die weder Hormonrezeptoren, noch eine HER2-Überexpression aufweisen und für die folglich keine der aktuell verfügbaren rezeptorgerichteten Pharmakotherapien infrage kommt, umfassen einen Anteil von ca. 20% aller Mammakarzinome. Deren ebenfalls schlechte Prognose gründet sich mitunter sowohl auf die höhergradige Entdifferenzierung ihrer Zellverbände als auch auf den Mangel an Behandlungsalternativen zur konventionellen Chemotherapie [13].

2.2 Osteosarkom

Mit einer Inzidenz von 0,2-0,3 pro 100000 Einwohnern pro Jahr in Deutschland gehört das Osteosarkom zwar zur Kategorie der seltenen Neoplasien, ist jedoch der häufigste maligne Knochentumor des Kindes- und Jugendalters. Bevorzugte Lokalisationen sind insbesondere die Metaphysen langer Röhrenknochen. Da die von undifferenziertem mesenchymalen Gewebe abstammenden osteo-, chondro- oder fibroblastischen Tumorzellen zumeist Osteoid bzw. Knochen bilden, manifestieren sich Osteosarkome initial mit progredienten Belastungs-abhängigen Schmerzen sowie später mit lokaler Schwellung und Bewegungseinschränkung im angrenzenden Gelenk und evtl. mit pathologischen Frakturen. Die aktuellen Leitlinien der AWMF empfehlen zur Therapie des Osteosarkoms die chirurgische Entfernung sowohl des Primärtumors als auch Metastasen eventueller resektabler sowie die neoadjuvante und adjuvante Polychemotherapie. In diesem Zusammenhang erweist sich insbesondere das histologische Ansprechen auf die neoadjuvante Pharmakotherapie als aktuell aussagekräftigster Prognosefaktor [14]. Im Rahmen experimenteller und klinischer Studien wird auch für das Osteosarkom die prognostische Relevanz einer HER2Überexpression, die sich in 35 bis 45% der Biopsieproben bzw. Operationspräpate nachweisen lässt und die wiederum mit ungünstiger histologischer Responsivität auf neoadjuvante Chemotherapie sowie mit einer kürzeren Ereignis-freien Überlebensdauer assoziiert ist, diskutiert [15-17].

2.3 TRAIL

2.3.1 Physiologische Funktion

TRAIL (TNFSF10, Apo2L), ein der TNF-Familie angehörendes Transmembranprotein aktivierter T-, NK-, dendritischer Zellen, Monozyten und Makrophagen, fungiert als Effektor immunvermittelter Zytotoxizität. Die Initiation jener Effekte setzt hierbei stets die Ligandierung von membranständigen, von Zielzellen konstitutiv exprimierten bzw. induzierbaren Rezeptoren der TNFR-Superfamilie, den sogenannten Death Receptors, voraus, die über Rekrutierung von Adapterproteinen das TRAIL-induzierte Apoptose-Signal nach intrazellulär transduzieren. Die von T- und NK-Zellen auf diese Weise eingeleitete Elimination entarteter Zellen ist Grundlage der vielfach beschriebenen zytotoxischen Wirkung TRAIL-Rezeptor-aktivierender Pharmaka [1, 18-21].

Eine im Mausmodell simulierte *TRAIL*- bzw. *TRAIL*-Rezeptor-Defizienz zeigte darüber hinaus, dass sich *TRAIL*- bzw. *TRAIL*-Rezeptor-knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Individuen als anfälliger gegenüber chronischer Inflammation, chemisch induzierter Karzinogenese bzw. Metastasierung sowie autoimmunen Pathologien erwiesen [22-26].

TRAIL fungiert folglich als Effektormolekül eines zellspezifisch induzierbaren Signaltransduktionssystems, das über selektive Apoptose-Induktion Prozesse der Inflammation und Infektion, Immuntoleranz, Kanzerogenese und Metastasierung moduliert.

2.3.2 Mechanismen der *TRAIL*-vermittelten Apoptose-Induktion in Tumorzellen

Derzeit sind fünf verschiedene *TRAIL*-bindende Subtypen der *TNFR*-Familie beschrieben: *DR*4 (*TRAIL-R1*, *TNFRSF*10a) und *DR*5 (*TRAIL-R2*, *TNFRSF*10b, Killer/Trick) transduzieren über intrazelluläre Domänen, sogenannte *DD*s, Apoptose-Signale und vermitteln demnach die oben beschriebenen physiologischen Funktionen des *TRAIL-Pathways*. Die Rezeptoren DcR1 (*TRAIL-R3*, *TNFRSF*10c, *LIT*, *TRID*), der

über keine, und DcR2 (*TRAIL-R4*, *TNFRSF*10d, *TRUNDD*), der allenfalls über eine unvollständige dysfunktionelle *DD* verfügt, sowie das Rezeptor-Dimer OPG (*TNFRSF*11b) vermögen *TRAIL*-Homotrimere zwar zu ligandieren, jedoch keinerlei proapoptotische Signaltransduktion zu initiieren [18, 27].

Die Bindung von DRs durch TRAIL erfolgt über die Formation von Liganden- und Rezeptor-Homotrimeren resultiert zunächst in und einer Aktivierung zytoplasmatischen DDs [28], die folglich mit DDs intrazellulärer Adapterproteine assoziieren. Ein proapoptotischer Vertreter jener Adapterproteine ist das sogenannte FADD [29], das über DD-DD-Interaktion Rezeptoren der TNFR-Familie bindet sowie über eine Effektordomäne, die DED, verfügt. Mittels jener DED vermag FADD indes weitere DED-haltige Proteine - entweder Procaspase 8 oder Procaspase 10, die Proformen Apoptose-initiierender Proteasen, – an den Rezeptorkomplex zu rekrutieren. Die sich auf diese Weise assemblierende Signaltransduktionseinheit – bestehend aus TRAIL-Homotrimer, DR-Homotrimer, FADD und Procaspase 8 oder 10 – bildet den Initiator der nun folgenden Apoptose-Induktion, den sogenannten DISC, an dem die autokatalytische Prozessierung der Procaspasen 8 und 10 zu aktiven Initiator-Caspasen zweier distinkter Zelltyp-abhängiger proapoptotischer Signalkaskaden stattfindet: in sogenannten Typ-I-Zellen erfolgt Caspase-8- bzw. -10-abhängig die direkte Prozessierung der Procaspasen 3 und 7, deren Spaltprodukte als Effektor-Caspasen die De-Assemblierung zellulärer Strukturprotein- und Enzymkomplexe, die Aktivierung Caspase-abhängiger DNAsen, einen Arrest des Zellzyklus sowie den Verlust von Zellkontakten einleiten. In Typ-II-Zellen hingegen erfordert die suffiziente Induktion jener Prozesse eine Amplifikation der DISC-vermittelten Caspase-Kaskade über die Desintegration der Mitochondrien durch Aktivierung proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie: Die Rekrutierung von Bid – einem initiierenden Vertreter jener Protein-Kategorie – an den *DISC* ermöglicht dessen *Caspase*-8- bzw. -10-abhängige Prozessierung zu tBid. Jenes Spaltprodukt vermag zum Mitochondrium zu translozieren und vor Ort weitere Vertreter, insbesondere Bax und Bak, zu aktivieren, die über eine Strukturstörung der äußeren Membran des Organells die Freisetzung mitochondrialen Proteins Cytochrom C sowie die Depression des mitochondrialen Membranpotenzials einleiten. Zytoplasmatische Cytochrom-C-Einheiten assoziieren folglich mit Adapterproteinen vom Typ APAF1 zum sogenannten Apoptosom, einem suborganellären molekularen Cluster, das die Initiator-Procaspase 9 rekrutiert und als aktivierender Bestandteil eines *Caspase*-9-Holoenzyms fungiert. Jenes generiert durch Prozessierung ihrer Proformen die Effektor-*Caspasen* 3 und 7, auf deren Ebene Typ-I-und Typ-II-Zell-spezifische Apoptose-Wege konvergieren [30-36].

Intensität und Effizienz der so in Typ-I- und Typ-II-Zellen ablaufenden Signaltransduktion, die auf allen der genannten Ebenen modulierbar sind, determinieren die Suszeptibilität einer Tumorzell-Spezies gegenüber *TRAIL*-vermittelter Apoptose-Induktion. Jene Modulierbarkeit begründet jedoch auch die Tatsache, dass etwa 50% der bisher untersuchten Tumorzell-Linien entweder initial oder nach wiederholter Exposition *TRAIL*-Resistenzen aufweisen [21].

2.3.3 Mechanismen verminderter Tumorzell-Sensitivität gegenüber TRAIL

2.3.3.1 Mechanismen auf Ebene der TRAIL-Rezeptoren einschließlich des DISC

Vergleiche maligner und benigner Zelllinien zeigen zwar keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der TRAIL-Rezeptor-Expression und der TRAIL-Responsivität [37, 38], dennoch vermag eine Herunterregulierung membranständiger DR's innerhalb einer Zelllinie deren Responsivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose einzuschränken [39]: in diversen TRAIL-resistenten Tumorzelllinien wurde demnach ein epigenetisches Silencing der DR-Proteine durch DNA-Hypermethylierung oder Histon-Deacetylierung in Promotorregionen der codierenden Gene nachgewiesen. Des Weiteren werden eine Reduktion der DR-mRNA-Stabilität sowie posttranslationale Mechanismen jener Rezeptor-Downregulation diskutiert [40-42]. Neben den Rezeptor-Expressionsraten erweist sich jedoch auch deren Funktionalität als Ausgangspunkt einer verminderten Ansprechbarkeit von Tumorzellen gegenüber TRAIL: Mutationen oder Polymorphismen der *DD*s oder der Liganden-Bindungs-Domänen können hierbei einen Effektivitätsverlust der TRAIL-Signaltransduktion bedingen [32].

Eine weitere Gruppe auf *DISC*-Ebene agierender Resistenzmechanismen umfasst die Reduktion aktiver *Caspase*-8-Einheiten. Dies kann sowohl aus einer Mutation des codierenden Gens sowie aus einer Hypermethylierung dessen transkriptionsregulatorischer Sequenzen, als auch aus der posttranslationalen Degradierung des entsprechenden Proteins resultieren [38, 40, 43]. Die Rekrutierung und Aktivierung der *Procaspasen* 8 und 10 im Rahmen der *DISC*-Formation wird zudem durch das zytoplasmatische Protein *FLIP* gehemmt, einem Struktur-Homolog jener Initiator-

Procaspasen, das mittels zweier *DED*s das Adapterprotein *FADD* bindet und als ausschließlicher Platzhalter einen Arrest der *DR*-induzierten Signaltransduktion bedingt. Entscheidend für die Intensität der Apoptose-Induktion ist hierbei das quantitative Verhältnis potenziell rekrutierbarer *Procaspase*- und *FLIP*-Einheiten [38, 40, 43, 44].

2.3.3.2 Mechanismen unterhalb der TRAIL-Rezeptoren

Eine verminderte Tumorzell-Suszeptibilität gegenüber *TRAIL*-induzierter Apoptose vermag außerdem aus der Inaktivierung von Initiator- und Effektor-*Caspasen* unterhalb des *DISC* zu resultieren. Von sogenannten "Inhibitors of Apoptosis Proteins" (IAPs) binden und inaktivieren die Vertreter *cIAP1*, *cIAP2* und *XIAP* vornehmlich die Effektor-*Caspasen* 3 und 7 sowie die Initiator-*Procaspase* 9. Des Weiteren induziert *XIAP* mittels einer Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität die proteasomale Degradation aktiver *Caspase*-3-Einheiten. Survivin, ein während der Fetalentwicklung exprimiertes Protein, das in transformierten und proliferierenden Zellen einer Re-Induktion unterliegt, inhibiert im Rahmen der Zellzyklus-Progression die Apoptose-Induktion am G2/M-Kontrollpunkt. Auch für *Survivin* sind eine Bindung und Inaktivierung der *Caspasen* 3 und 7 sowie eine Hemmung der Rekrutierung von *Procaspase* 9 zum Apoptosom beschrieben [45-50].

Besondere Bedeutung für die Apoptose-Induktion in Typ-II-Zellen haben die eingangs genannten Proteine der Bcl2-Familie, deren Summen-Effekt aus dem quantitativen Verhältnis pro- und antiapoptotischer Vertreter resultiert. Für den Vertreter *Mcl-1* konnte beispielsweise eine Interaktion mit *tBid* mit konsekutiver Inhibition der *TRAIL*-vermittelten Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Eine Abnahme der *TRAIL*-Sensitivität kann außerdem aus der Unterrepräsentation proapoptotischer Vertreter, z.B. infolge Mutations-bedingter Ausschaltung von *Bax* und/oder *Bak*, resultieren [30, 32, 33, 45, 51].

2.3.4 Strategien der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber TRAILinduzierter Apoptose

Die den vorgenannten Mechanismen verminderter *TRAIL*-Sensitivität zugrunde liegenden Signaltransduktionskomponenten bieten Angriffspunkte für die Kombination agonistischer *DR*-Liganden mit Agentien, die eine Verstärkung oder Reaktivierung *DR*-induzierter Apoptose-Stimuli vermitteln. In experimentellen Studien identifizierte Substanzen derartigen Potenzials sind z.B. *DNA*-schädigende Agentien wie Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil; des Weiteren Taxane, Histon-Deacetylase-

und Proteasomen-Inhibitoren, Interferone, Polyphenole, Vitamin-E-Derivate, *PPARy*-Liganden und Retinoide. Zugrunde liegende Mechanismen der Erhöhung der *TRAIL*-induzierten Zytotoxizität sind zumeinst eine Hochregulation von *DR*4 und/oder *DR*5, eine *Downregulation* von *FLIP* oder IAPs, die Expressionsmodulation von Proteinen der *BcI-2*-Familie sowie die Aktivitätssteigerung von *Caspasen*. Jene experimentell erworbenen Erkenntnisse ebnen hierbei den Weg zur Untersuchung des Effektes *DR-Pathway*-modulierender Pharmaka auf die Suszeptibilität diverser Tumoren gegenüber *TRAIL*-basierten Therapeutika im Rahmen klinischer Studien [21, 35, 37, 38, 52].

2.3.5 TRAIL-vermittelte Effekte beim Mammakarzinom

In-vitro-Studien zur TRAIL-Responsivität des Mammakarzinoms zeigten sowohl, dass sich ein Großteil der untersuchten Zellkulturen primär resistent verhält, als auch dass der Grad der TRAIL-vermittelten Apoptose-Induktion Phänotyp-abhängig variiert: demnach erwiesen sich zehn von vierzehn triple-negativen Zelllinien, die per definitionem weder Hormonrezeptoren exprimieren noch HER2 amplifizieren, als TRAIL-sensitiv. Während diese vorrangig mesenchymale Eigenschaften zeigten, waren die TRAIL-resistenten triple-negativen Zelllinien dem epithelialen Phänotyp zuzuordnen. Des Weiteren war auch an sieben von sieben ER-positiven sowie sechs von acht HER2-amplifizierenden Mammakarzinom-Zelllinien ein Zusammenhang von TRAIL-Resistenz und epithelialem Phänotyp nachweisbar. Lediglich zwei der HER2überexprimierenden Zelllinien, die ebenfalls epitheliale Eigentschaften aufwiesen, reagierten allenfalls moderat responsiv gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Zusammenfassend zeigten sich vor allem triple-negative Mammakarzinom-Zelllinien mit mesenchymalem Phänotyp sensitiv gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Des Weiteren war jene TRAIL-vermittelte Vitalitätsreduktion je nach Responsivität der Zelllinie mit einer mehr oder minder starken Caspase-Aktivierung assoziiert. Trotzdem sämtliche Kulturen jedes untersuchten Zelltyps mindestens einen Death-Receptor-Subtypen, hauptsächlich jedoch DR5, aufweisen, konnte bisher kein Zusammenhang zwischen DR-Expressionsgrad und TRAIL-Sensitivität festgestellt werden. Dennoch zeigte eine Knockdown-Studie an TRAIL-suszeptiblen Mammakarzinom-Zellen die vorrangige Relevanz des DR5 für TRAIL-vermittelte proapoptotische Effekte. Auch in resistenten Zelllinien resultierte eine Steigerung jener Wirkungen mitunter aus der Hochregulation von DR4, DR5 und proapoptotischen Bcl-2-Proteinen, aus der Downregulation von Survivin, XIAP, FLIP und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen sowie

aus der Aktivierung von *Caspasen*. Eine Modulation eben dieser entlang des *TRAIL-Pathways* agierenden Signaltransduktionskomponenten konnte unter anderem durch Kombination von *DR*-Agonisten mit diversen Zytostatika erzielt werden. In-vitro-Untersuchungen zur Toxizität jener Kombinationsregime ergaben jedoch erhöhte Apoptose-Raten gesunder mammärer Epithelzellen. Aus diesem Grunde kämen für eine Kombination im Rahmen einer *TRAIL*-basierten Pharmakotherapie des Mammakarzinoms am ehesten tumor-spezifischere und/oder weniger toxische Agentien infrage [39, 53-55].

2.3.6 TRAIL-vermittelte Effekte beim Osteosarkom

Voraussetzung für die TRAIL-vermittelte Transduktion proapoptotischer Stimuli nach intrazellulär ist die Ligandierung von DR's auf der äußeren Oberfläche der Zellmembran. Proteom- und Transkriptom-Analysen an Osteosarkom-Biopsien bzw. Osteosarkom-Zelllinien ergaben entsprechend DR-Expressionsraten von 70% bzw. 100% der untersuchten Proben. Im Rahmen einer präklinischen in-vitro-Studie zu TRAIL-vermittelten Effekten auf die Progression von Knochentumoren konnte an vier von sieben untersuchten Osteosarkom-Zelllinien eine Sensitivität gegenüber TRAILinduzierter Apoptose nachgewiesen werden, die mit der Aktivierung von Caspase 8 korrelierte. Mausmodelle zur Untersuchung der Etablierung und Progression primärer Knochentumoren und deren Metastasen zeigten des Weiteren eine TRAIL-abhängige Reduktion sowohl der Inzidenz von Osteosarkomen als auch der Dissemination assoziierter Lungenherde sowie eine Zunahme des Gesamtüberlebens. In einer weiteren laborexperimentellen Arbeit erwies sich lediglich eine von sechs Osteosarkom-Zelllinien als TRAIL-responsiv. Die TRAIL-vermittelte Apoptose-Induktion war auch hier Caspase-3- und Caspase-8-abhängig. Deren Augmentation in primär gering zudem Kombination suszeptiblen Zelllinien konnte durch von TRAIL Chemotherapeutika gezeigt werden und war darüber hinaus mit einer Hochregulation der DR's sowie einer Amplifikation der Caspase-3-Aktivität assoziiert. In gemeinen humanen Knochenzellen hingegen ergab eine Inkubation mit TRAIL keinerlei zytotoxischen Effekt [56, 57]. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Responsivität von Osteosarkom-Zellen auf eine TRAIL-vermittelte Apoptose-Induktion trotz mehrheitlicher Expression von DR's Zelltyp-abhängig variiert und dass jene zytotoxischen Effekte in Zelllinien geringer Suszeptibilität durch eine Kombination von *TRAIL* mit Apoptosemodulierenden Pharmaka steigerbar sind. Da zudem die Zytotoxizität auf Tumorzellen
begrenzt bleibt, kann eine Applikation *TRAIL*-basierter Mono- oder
Kombinationstherapien als Alternative zur konventionellen Chemotherapie des
Osteosarkoms diskutiert werden.

2.3.7 Klinische Relevanz im Rahmen der Tumortherapie

Die klinische Anwendbarkeit rekombinanten humanen TRAILs sowie agonistischer, entweder DR4- oder DR5-selektiver Antikörper sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit weiteren antikanzerogenen Pharmaka ist Gegenstand teils bereits abgeschlossener und teils noch laufender klinischer Studien, die jeweils Patienten mit fortgeschrittenen, Therapie-refraktären oder rezidivierenden soliden Neoplasien bzw. Non-Hodgkin-Lymphomen einschließen. Bei regelmäßiger intravenöser Applikation traten bisher allenfalls vereinzelt Dosis-limitierende toxische Effekte auf. In Eskalations-Studien wurden maximal tolerierbare Dosierungen noch nicht erreicht. Häufig auftretende Nebenwirkungen umfassten Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Hypotension, Fieber und Müdigkeit. Erhöhungen der Transaminasen sind ebenfalls beschrieben, sodass bei Applikation hoher Dosen eine Hepatotoxizität nicht ausgeschlossen ist. Zusammenfassend wurde durch Anwendung DR-aktivierender Therapeutika in weniger als der Hälfte der Fälle ein allenfalls stabiler Krankheitsverlauf sowie vereinzelt ein partielles Ansprechen und selten eine Regression erreicht. Insbesondere der Anteil partieller Responsivität stieg infolge einer Kombination jener DR-Agonisten mit anderen Tumortherapeutika, von denen in aktuellen Studien Folinsäure/5-Fluorouracil/Irinotecan, Doxorubicin, Gemcitabin, Capecitabin, Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, Bortezomib, Bevacizumab, Rituximab oder der IGF-1-Rezeptor-Antikörper AMG479 zur Anwendung kommen [19, 35, 58].

Untersuchungen von Zusammenhängen zwischen *TRAIL*-Rezeptor-Dichte in Gewebeproben humaner Mammakarzinome und klinischem Verlauf der zugehörigen Patientinnen ergaben eine positive Korrelation hoher *DR*5-Expression mit der Malignität bzw. dem Grading des Tumors, erhöhten Proliferationsindizes, dem Risiko einer Lymphknotenbeteiligung sowie einem geringeren Gesamtüberleben. Die Datenlage zu Korrelationen der *DR*4-Dichte mit diversen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms liefert hingegen teils kontroverse Resultate [59-61]. Im Rahmen einer Phase-I-Studie

zur klinischen Anwendbarkeit des *DR*5-agonistischen monoklonalen Antikörpers Tigatuzumab erlitt die einzige eingeschlossene Mammakarzinom-Patientin eine Progression ihrer Malignomerkrankung [62]. Eine Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit einer Kombination des *DR*5-agonistischen monoklonalen Antikörpers LBY135 mit dem Zytostatikum Capecitabin zeigte neben der partiellen Responsivität eines von sieben Mammakarzinomen auch eine signifikante Reduktion des Tumormarkers CA15.3 im Serum zweier weiterer Brustkrebs-Patientinnen [63]. Oben genannte Daten implizieren für Mammakarzinome insbesondere dann ein eventuelles Ansprechen auf *TRAIL*-Rezeptor-aktivierende Pharmaka, wenn jene in Kombination mit Tumortherapeutika anderer Substanzklassen verabreicht werden.

Klinische Studien an Sarkompatienten konnten hingegen in Einzelfällen die Wirksamkeit TRAIL-Rezeptor-aktivierender Pharmaka als Monotherapie belegen: entsprechend zeigten drei von neunzehn Sarkompatienten unter der Behandlung mit Lexatumumab, einem monoklonalen DR5-agonistischen Antikörper, einen stabilen Krankheitsverlauf, darunter einer von sieben Patienten mit Osteosarkom [64]. Die Anwendung von Lexatumumab in einer weiteren Phase-I-Studie war zudem in fünf von neun pädiatrischen Osteosarkom-Fällen mit einem stabilen Krankheitsverlauf assoziiert. Trotzdem kein komplettes oder partielles Ansprechen offensichtlich war, zeigte eine der Osteosarkom-Patientinnen sowohl unter als auch bis zu ein Jahr nach der Therapie mit Lexatumumab eine Remission der anfangs bestehenden Symptome. Während jenes Zeitraums war darüber hinaus keine der initial vorhandenen malignen Läsionen im Positronenemissionstomogramm nachweisbar [65]. Auch Patienten mit Sarkomen anderer Gewebe, etwa des Knorpels oder der Gefäße, profitierten bereits in Form einer Stabilisierung des Krankheitsverlaufs bzw. einer partiellen Responsivität von einer Behandlung mit TRAIL-Rezeptor-agonistischen Substanzen, sodass zusammenfassend ein gewisses Potenzial jener Pharmaka als Monotherapie in einzelnen Fällen solider Tumore mesenchymalen Ursprungs angenommen wird [64-68].

2.4 Retinoide

Der Begriff Retinoide umfasst sowohl sämtliche natürliche Metabolite als auch synthetische Derivate von Polyisoprenoiden der Vitamin-A-Gruppe, die entweder als solche oder in Form von Provitamin A – dem Carotin – über die Nahrung aufgenommen werden und von denen das Retinol (Vitamin A₁) den bekanntesten Vertreter darstellt.

Während die Metabolite 11-cis- und all-trans-Retinal als Bestandteile des Rhodopsins an Prozessen der retinalen Photorezeption beteiligt sind, regulieren die Derivate all-trans- und 9-cis-Retinoat als Aktivatoren Transkriptions-regulierender nukleärer Hormonrezeptoren Schlüssel-Ereignisse in Onto- und Kanzerogenese. Hierzu gehören unter anderem die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und die Apoptose [69-73]

2.4.1 Retinoid-Rezeptoren und deren Liganden

Retinoid-Rezeptoren gehören als Liganden-aktivierbare Transkriptionsfaktoren zu den nukleären Hormonrezeptoren, die charakterisiert sind durch je eine Liganden-bindende Region, die den Status der Rezeptor-Aktivierung determiniert, sowie durch je eine DNAbindende Domäne, die die Rezeptor-Assoziation mit entsprechenden Retinoid-Response-Elementen – Transkriptions-regulierenden Abschnitten innerhalb Promotorregionen der jeweiligen Ziel-Gene – vermittelt. Retinoid-Rezeptoren existieren in Form zweier Klassen distinkter Liganden-Bindungs-Spezifitäten, den Retinoat- (RAR) und den Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), die sich jeweils in α -, β - und γ -Isotypen unterteilen lassen. Die eingangs erwähnten Stereoisomere all-trans- und 9-cis-Retinoat fungieren als deren natürliche Liganden: während der RAR sowohl durch atRA als auch durch 9cisRA aktiviert wird, bindet der RXR lediglich 9cisRA. RAR und RXR assoziieren zunächst Liganden-unabhängig – entweder als RXR-Homotetramere, die nach Ligandenbindung in RXR-Homodimere dissoziieren, oder als RAR/RXR-Heterodimere – mit Retinoid-Response-Elementen der jeweiligen Zielgene. Voraussetzung der Ligandierung von Retinoiden ist deren Translokation vom Zytosol in den Zellkern, die eine Assoziation mit intrazellulären, Signalmotive nukleärer Lokalisierung exponierenden Proteinen erfordert. [6, 74, 75].

2.4.2 Retinoid-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in Tumorzellen

RAR und RXR vermitteln Retinoid-induzierte Transkriptions-regulierende Effekte als Liganden-aktivierte RXR-Homo- oder RAR/RXR-Heterodimere (gleichwohl vermag RXR auch als Bestandteil von Heterodimeren weiterer Nukleohormonrezeptoren zu fungieren). Retinoid-Rezeptor-Zielgene beinhalten mitunter Transkriptions-regulatorische Sequenzen, die als Retinoid-Response-Elemente bezeichnet werden und an denen ein zunächst unaktiviertes Retinoid-Rezeptordimer residiert.

Eine Retinoid-vermittelte Aktivierung jener Rezeptor-Komplexe bedingt über deren Konformationsänderung die Rekrutierung von HAT-Aktivitäten einerseits sowie die Etablierung von Kontaktstellen für die Assoziation von Proteinen der Transkriptions-Maschinerie andererseits. Es resultiert eine Steigerung der Transkriptions-Initiations-Frequenz des entsprechenden Zielgens [6, 7, 74].

Die auf diese Weise durch natürliche oder synthetische Retinoide vermittelten Genregulatorischen Effekte bedingen folglich Alterationen von Signaltransduktionskomponenten komplexer Proliferations- und Apoptose-modulierender Prozesse. Auch eine Retinoid-vermittelte Steigerung der Intensität *TNFR*-induzierter proapoptotischer Signalwege ist bereits an diversen Tumorzelllinien untesucht worden [84]: ursächlich und begleitend beteiligt sein können hierbei die Retinoid-abhängige Induktion sowohl der Rezeptoren *DR4*, *DR5* und *Fas* [37, 52, 76, 85] als auch des Liganden *TRAIL* [5, 86], eine Steigerung der Aktivitäten der *Caspasen* 8, 9, 7, 3 sowie die Cytochrom-C-Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum [76, 85, 87]. Weiterhin konnte eine Retinoid-abhängige Herunterregulation der die Integrität mitochondrialer Membranen stabilisierenden Proteine *Bcl-2* bzw. Bcl-x_L sowie eine Steigerung der *Bax*-Translokation zum Mitochondrium gezeigt werden. Schließlich sind auch eine Reduktion der *Survivin*-Expression sowie eine Hochregulation des Tumor-Suppressor-Proteins p53 beschrieben. [6, 79, 88].

Unter anderem auf vorgenannte Mechanismen vermag sich das antikanzerogene Potenzial der Retinoide zu gründen, das sich an Tiermodellen der Karzinogenese in Form einer Prävention bzw. einer Inhibition der Promotion von Tumoren verschiedener Entitäten zeigte. Des Weiteren können Retinoide eine Re-Differenzierung von auf Grundlage eines Differenzierungs-Blocks entstandenden Tumorzellverbänden initiieren. [5, 7].

2.4.3 Retinoid-vermittelte Effekte beim Mammakarzinom

Im Rahmen zahlreicher präklinischer in-vitro-Studien gelang an diversen Mammakarzinom-Zellen bereits der Nachweis einer Retinoid-vermittelen Induktion von Apoptose und Inhibition der Zellproliferation. Des Weiteren führte die Applikation von Retinoiden in Tiermodellen sowohl zur Hemmung der Initiation und Promotion als auch zur Remission karzinogen-induzierter mammärer Tumorläsionen. Laborexperimentelle Arbeiten zur Exploration von Zusammenhängen zwischen Retinoid-Responsivität und Nukleohormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms zeigten, dass die Mehrheit ERpositiver Zelllinien und Biopsie-Proben hohe *RAR*α-Expressionsraten aufwies und

entsprechend sensitiv gegenüber Retinoid-vermittelter Proliferationshemmung war. ER-Negativität korrelierte hingegen mehrheitlich mit allenfalls niedriger bzw. nicht detektierbarer RARa-Expression sowie mit der Resistenz gegenüber Retinoiden. Die Tatsache, dass erstens dennoch ER-negative Zelllinien mit hoher RARα-Expression und hoher Retinoid-Responsivität existieren und dass zweitens die RARα-Transfektion eine Sensitivierung ER- und RARα-negativer Zelllinien gegenüber Retinoid-vermittelter Proliferationsinhibition induzierte, ließ demnach die Schlussfolgerung zu, dass ER-Positivität zwar mit Alterationen der Retinoid-Wirkung assoziiert sein kann, jedoch keine notwendige Bedingung für das antikanzerogene Potenzial jener Stoffgruppe darstellt. Entscheidende Determinante in diesem Zusammenhang ist vielmehr die RARa-Expressionsdichte [70, 89-99]. Entsprechend resultierte eine Inkubation sowohl der ERpositiven, RARα amplifizierenden Mammakarzinom-Zelllinie T47D, als auch der ERnegativen, RARα amplifizierenden Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3 mit atRA in einer Redifferenzierung und Proliferationsinhibition, in einem Zellzyklusarrest sowie in der Induktion von Apoptose. Darüber hinaus war jene Retinoid-vermittelte Zytotoxizität in SK-BR-3-Zellen mit einer Überexpression von Caspase-Genen, einer Prozessierung ihrer Translationsprodukte sowie einer *Downregulation* von *HER2* assoziiert [91, 100].

2.4.4 Retinoid-vermittelte Effekte beim Osteosarkom

Da sich Osteosarkome nicht zuletzt auf der Grundlage eines Differenzierungdefekts mesenchymaler Stamm- oder Osteoprogenitorzellen entwickeln, stellt eine Reinduktion von Zellreifungsprozessen, die in vitro bereits durch Applikation diverser Liganden nukleärer Hormonrezeptoren erreicht werden konnte, eine sinnvolle Alternative zur konventionellen Chemotherapie jener Tumorentität dar. Der Nachweis der Expression mindestens einer *RXR*-Isoform sowie sämtlicher *RAR*-Isoformen in vier von vier untersuchten Osteosarkom-Zelllinien sowie in zehn von zehn untersuchten primären Osteosarkom-Kulturen lieferte zudem die notwendige Bedingung für die Annahme einer potenziellen Responsivität gegenüber Retinoiden. Neben oben genannten Merkmalen der osteogenen Differenzierung, die nach Behandlung mit *atRA* oder *9cisRA* sowohl an humanen als auch an caninen Osteosarkom-Zelllinien nachweisbar waren, zeigten jene Retinoide jedoch auch eine antiproliferative sowie proapoptotische Wirkkomponente. Entsprechend erwiesen sich zwei von vier humanen Osteosarkom-Zelllinien als sensitiv gegenüber Retinoid-vermittelter Reduktion der Viabilität und Induktion von Apoptose. Durch eine Kombination mit *PPARy*-Liganden konnten jene Effekte auch in den initial

Retinoid-resistenten Zelllinien erreicht werden. Am Mausmodell war des Weiteren nachzuweisen, dass eine Überexpression von RXRα oder RARα im Tumor-Transplantat zwar mit der Induktion der terminalen Differenzierung sowie einer erhöhten Nekroserate einherging. Dennoch vermochte sowohl die Amplifikation der Retinoidrezeptoren allein als auch deren Kombination mit einer Überexpression von PPARy lediglich eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, nicht iedoch die eigentliche Progressionhemmung des Osteosarkoms zu effizieren. Jener Sachverhalt sowie die Tatsache der Existenz humaner Osteosarkomzellen geringer Responsivität gegenüber Retinoid-vermittelter Apoptose-Induktion verdeutlichen, dass der klinische Erfolg einer Therapie des Osteosarkoms mit Liganden nukleärer Hormonrezeptoren womöglich deren Kombination mit Wirkstoffen anderer Substanzklassen erfordert [17, 56, 102-104].

2.4.5 Klinische Relevanz im Rahmen der Tumortherapie

Das präventive Potenzial von Retinoiden im Rahmen der Karzinogenese ist bereits an präklinischen Modellen, insbesondere für Tumoren des oberen Gastro-Intestinal-Traktes, der Haut, der Brust, der Cervix und der Ovarien, nachgewiesen [5, 93]. Dennoch rechtfertigt die unzureichende epidemiologische Datenlage derzeit keine generelle Aussage zum Nutzen der Retinoide in der Primärprävention maligner Neoplasien. Dem entsprechend bilden hauptsächlich Studien zur Sekundärprävention den Grundstein des aktuellen Wissensstands [105].

Tabelle 1 zeigt eine Auswahl klinischer Studien zur Retinoid-basierten Sekundärprävention, Mono- und Kombinationstherapie des Mammakarzinoms.

Pharmaka	Studien -Phase	Patientenkollektiv	Outcome	Referenz
Fenretinid (4-HPR)	III	Mammakarzinom Stadium I (pT1-2 N0 oder <i>DIN</i>)	Reduktion kontra- und ipsilateraler sekundärer Mammakarzinome um 38% bei prämenopausalen Patientinnen	[106, 107]
Fenretinid (4-HPR) + Tamoxifen	III	Mammakarzinom (pT2/3 oder pN1/2; kein Hinweis auf M1) ER- oder PR-positiv postmenopausal	keine signifikanten Unterschiede zwischen der Tamoxifen/Placebo- und der Tamoxifen-Fenretinid-Gruppe im Gesamt-Überleben, im Krankheits-freien Überleben, in der Zeit bis zum Rezidiv	[108]
Fenretinid (4-HPR) + Tamoxifen	I/II	metastasiertes Mammakarzi- nom ER- oder PR-positiv	in der Tamoxifen-Gruppe hatten 2 von 3, in den Tamoxifen- Fenretinid-Gruppen hatten insgesamt 10 von 12 Patientinnen einen klinischen Vorteil	[109]
Tretinoin (atRA)	II	metastasiertes Mammakarzi- nom	von 14 Patientinnen 1 PR und 3 SD von kurzer Dauer	[110]
Tretinoin (atRA) + Tamoxifen	1/11	Mammakarzinom Stadium IV bzw. Rezidiv ER-, PR-positiv oder unbe- kannter Hormonrezeptorstatus	von 20 Tamoxifen-resistenten Patientinnen 1 PR und 5 SD unter Kombination von Tamoxifen mit Tretinoin	
Alitretinoin (9cisRA)	I	solide Tumoren, 3 davon Mammakarzinome	von 3 Mammakarzinom-Patientinnen 3 SD	[112]
Alitretinoin (9cisRA) + Tamoxifen	ı	metastasiertes Mammakarzi- nom	von 9 Patientinnen 1 PR und 1 CR	[113]

Tabelle 1. Klinische Studien zur Retinoid-Wirkung in der Therapie und Prävention des Mammakarzinoms. PR – partial response, CR – complete response, SD – stable disease, PD – progressive disease, *DIN* – ductale intraepitheliale Neoplasie, Kombinationsstudien grau hinterlegt, Studien zur Monotherapie weiß hinterlegt.

Die oben exemplarisch dargestellte klinische Datenlage verdeutlicht einen allenfalls präventiven bzw. Verlaufs-stabilisierenden therapeutischen Effekt einer Retinoid-Monotherapie des Mammakarzinoms. Jene Diskrepanz zwischen präklinischen und klinischen Ergebnissen lässt sich wie folgt erörtern: da ein Großteil der Studien zur Untersuchung des therapeutischen Effekts von Retinoiden Patientinnen metastasierten bzw. fortgeschrittenen Neoplasien einschloss und Mammakarzinome mit zunehmender Progression Merkmale der Differenzierung wie etwa die Nukleohormon-Rezeptor-Expression bzw. -Funktion einbüßen, ist anzunehmen, dass auch deren potenzielle Responsivität sowohl gegenüber einer endokrinen als auch gegenüber einer Retinoid-basierten Therapie abnimmt. Entsprechend ergaben auch klinische Studien selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulatoren mit diversen zur Kombination von Retinoiden lediglich vereinzelt moderate Ansprechraten (siehe Tabelle 1). Ein größerer klinischer Nutzen wäre demnach von einer Kombination Nukleohormon-Rezeptormodulierender Agentien mit antikanzerogenen Pharmaka anderer Substanzklassen zu erwarten [70, 114-121].

Im Rahmen von Phase-I-Studien an pädiatrischen Patienten mit diversen Therapierefraktären Neoplasien sprachen Osteosarkome weder auf die Applikation von Retinoiden als Monotherapie, noch auf deren Kombination mit Interferon α an [122-125]. Dennoch existieren zwei Fallberichte zu je einem pädiatrischen Patienten mit Therapie-refraktärem, pulmonal metastasiertem, inoperablem Osteosarkom, von denen einer unter Therapie mit atRA und Interferon α ein partielles Ansprechen, der andere unter Therapie mit atRA, Interferon α und Zoledronat einen stabilen Krankheitsverlauf bot [126, 127]. Demnach ist anzunehmen, dass Retinoide allenfalls in Kombination mit weiteren Tumortherapeutika für die Behandlung des Osteosarkoms infrage kommen.

2.5 Grenzen aktueller Standards der systemischen Therapie des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms – Nutzen einer Kombination von *TRAIL* mit Retinoiden

Die Ansprechrate des metastasierten Mammakarzinoms auf entsprechende pharmakologische Standardtherapien beträgt je nach Rezeptorstatus in der Erstlinientherapie zwar bis zu 70%, nach variabler Behandlungsdauer tritt dennoch häufig trotz adäquater systemischer Therapie die Progredienz infolge verminderter Responsivität der Tumorzellen ein. Insbesondere metastasierte Tumoren, für deren

Therapie der Erfolg einer pharmakologischen Zytostase von besonderer Bedeutung ist, weisen eine 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich etwa 20% auf. Jene Angaben verdeutlichen, dass mit zunehmender Behandlungsdauer bzw. mit zunehmender Progression die Suszeptibilität mammärer Neoplasien gegenüber aktuell angewandten Standard-Therapeutika abnimmt. Hierbei zeigen neben distinkten amplifizierenden Subentitäten auch fortgeschrittene Hormonrezeptor-exprimierende Tumore geringe Responsivitäten gegenüber entsprechenden HER2-antagonistischen bzw. endokrinen Pharmakotherapien. Für triple-negative sowie einige HER2überexprimierende Mammakarzinome, die sich zwar initial sensitiv gegenüber Chemotherapeutika verhalten, sind zudem im Falle eines Therapieversagens außer weiteren Zytostatika keine suffizienten pharmakologischen Behandlungsalternativen verfügbar [12, 13, 128]. Als zugrunde liegender Mechanismus der oben geschilderten Resistenzbildung im Rahmen der Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen wird mitunter eine Transition der Tumorzellen vom epithelialen zum die mesenchymalen Phänotyp diskutiert. über eine Anderung Genexpressionsprofilen beispielsweise den Verlust von Nukleohormonrezeptor-Funktionen bedingen kann [114-121]. Da der präventive Nutzen von Retinoiden bezüglich der Genese von Mammakarzinomen bereits nachgewiesen ist und präklinische Daten eine Retinoid-induzierte Remission karzinogen-induzierter mammärer Neoplasien zeigten, wird angenommen, dass das antikanzerogene Potenzial iener Substanzklasse auch eine Drosselung von Entdifferenzierungsprozessen im Rahmen der oben beschriebenen Transition umfassen kann. Die proapoptotische Wirkung von TRAIL - insbesondere an triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien mesenchymalen Phänotyps – kann darüber hinaus zur Elimination primär mesenchymaler bzw. mesenchymal entarteter Tumorzellen beitragen. Die Retinoid-vermittelte Hochregulation von Caspasen und DR's vermag hierbei die Induktion von Apoptose zu triggern und erweist sich weiterhin als nutzbar für eine Sensitivierung von Tumor-Zellen geringer TRAIL-Responsivität. Die Konvergenz der TRAIL- und Retinoid-vermittelten Signaltransduktion auf Caspase- und DR-Ebene impliziert demnach eine wechselseitige Augmentation der jeweils induzierten Apoptose-Prozesse.

Ein Großteil der in den vergangenen zwanzig Jahren zur Optimierung der chemotherapeutischen Behandlung des Osteosarkoms durchgeführten klinischen

Studien ergab bis dato keine hinreichende Verbesserung des Outcomes, sodass noch immer klassische Zytostatika wie Methotrexat in hoher Dosis, Doxorubicin und Cisplatin, evtl. in Kombination mit Ifosfamid und/oder Etoposid, aktuelle Chemotherapie-Schemata dominieren. Die derzeitigen 5- und 10-Jahres-Überlebensraten unter adäquater chirurgischer und zytostatischer Therapie betragen ca. 70% und 65%. Metastasierung, Inoperabilität – z.B. bei axial lokalisierten Tumoren – sowie geringes Ansprechen auf o.g. Chemotherapeutika sind hierbei Faktoren, Langzeitüberleben deswegen erheblich beeinträchtigen, weil aktuell keine alternativen Pharmaka mit klinisch relevantem Effekt verfügbar sind. Darüber hinaus wirken sich insbesondere im Falle geringer Chemosensitivität – weder die Intensivierung noch die Modifizierung gängiger adjuvanter und neoadjuvanter zytostatischer Ansätze günstig auf das Ereignis-freie und Langzeitüberleben aus. Entsprechend sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe der sogenannten poor responders auf 35-47% sowie die 10-Jahres-Überlebensrate des metastasierten Osteosarkoms auf 20-25%. Das klinische Outcome dieser Patienten hängt demnach insbesondere von der Entwicklung wirksamer alternativer Therapieverfahren ab [14, 129-133]. Die Tatsache, dass Osteosarkom-Zelllinien unterschiedliche Responsivitäten sowohl gegenüber TRAIL als auch gegenüber Retinoiden aufweisen, erklärt hierbei die allenfalls geringe klinische Wirksamkeit der jeweiligen Monotherapien. Dennoch zeigten in-vitro-Studien an suszeptiblen Osteosarkom-Zelllinien die Induktion von Apoptose, die sowohl TRAIL- als auch Retinoid-vermittelt mit der Aktivierung von Caspasen einherging. Sowohl die Hochregulation von DR's als auch die Amplifikation der Caspase-Aktivität resultierten des Weiteren in einer Sensitivierung von Osteosarkom-Zellen gegenüber TRAILinduzierter Apoptose [56, 57, 134]. Retinoide vermögen zudem an Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten eine entsprechende Modulation jener Signaltransduktionskomponenten zu effizieren sowie pro- und antiapoptotische Vertreter der *Bcl-2*-Proteinfamilie zu regulieren [37, 85, 87, 134]. In Osteosarkom-Zellen fungieren folglich Caspasen und Bcl-2-Proteine als Schnittstellen TRAIL- und Retinoidvermittelter Signalwege, auf die sich eine eventuelle Augmentation der Apoptose-Induktion bei kombinierter Anwendung gründen kann.

2.6 Herleitung der Fragestellung

Die eingangs beschriebenen Signaltransduktionsprozesse agonistischer *TRAIL-* und Retinoid-Rezeptor-Liganden offenbaren Angriffspunkte für die Modulation von Apoptose

und Proliferation in Tumorzellen. Auf der Tatsache, dass sich beide Substanzgruppen über distinkte und auf den Ebenen der Bcl-2-Proteine, der Caspasen und der DR's überlappende Mechanismen auf die Tumorzellintegrität auswirken, basiert nunmehr die Hypothese einer Synergie bei kombinierter Anwendung. Die Problematik in vitro bestehender Einschränkungen der Tumorzell-Suszeptibilität gegenüber DR-vermittelten antiproliferativen und proapoptotischen Effekten und insuffizienter Responsivität solider Neoplasien auf eine Monotherapie mit DR-Agonisten rechtfertigt deren Kombination mit weiteren antineoplastischen Pharmaka zum Zweck der Tumor-selektiven Zytotoxizität. Retinoide **Optimierung** ihrer sind in diesem Zusammenhang deswegen besonders geeignet, weil sie nicht nur antikanzerogene Wirkungen entfalten. sondern auch Komponenten der TRAIL-assoziierten Signaltransduktion regulieren: demnach zeigten in-vitro-Studien an Bronchial-, Ovarial-, Prostata- und Ewing-Sarkom-Zelllinien bereits Kombinationseffekte von TRAIL und Retinoiden auf die Induktion von Apoptose, die sich mitunter auf die Retinoid-vermittelte Hochregulation von DR's und/oder die synergistische Augmentation der Spaltung von Bid und Procaspasen gründeten [85, 87, 135, 136].

Die im Folgenden erläuterten Experimente dienten der Identifizierung eventueller Kombinationseffekte von rekombinantem humanen *TRAIL* und *atRA* bzw. *9cisRA* auf Viabilität, Apoptose und Kolonie-Formations-Verhalten *DR*- und Retinoid-Rezeptor-exprimierender Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zelllinien. Überdies stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen im Hinblick auf die Expression bzw. Aktivität Apoptose-relevanter Signaltransduktionskomponenten. Ergänzend war die Möglichkeit eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Regulation ausgewählter Signaltransduktionsmechanismen und ermittelten Kombinationseffekten von Interesse.

Die Untersuchung oben genannter Fragestellungen erfolgte deswegen an in-vitro-Modellen des Mammakarzinoms und Osteosarkoms, weil die jeweiligen Zelllinien sowohl *DR*'s als auch *RAR*- und *RXR*-Isoformen exprimieren, weil für die jeweilige Entität sowohl epitheliale als auch mesenchymale Zelltypen existieren und weil diese im Vergleich untereinander ein weites Spektrum unterschiedlicher *TRAIL*- und Retinoid-Responsivitäten aufweisen. Jene Diversität der Eigenschaftsprofile des vorhandenen Zelllinien-Pools ist Voraussetzung für die Explorierbarkeit von Zusammenhängen

zwischen Zellphänotyp und Suszeptibilität gegenüber TRAIL, Retinoiden und deren Kombination.

Zum Zweck der Überprüfung einer Tumorzellselektivität *TRAIL*- und *atRA*- bzw. *9cisRA*- vermittelter Kombinationseffekte war abschließend deren Repdoduzierbarkeit an Gewebs-konformen nicht-neoplastischen Zelllinien von Interesse.

3 Methodik

3.1 Materialien zur Versuchsdurchführung

3.1.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Geräte	Hersteller
Brutschrank (HERA cell 240)	Heraeus
Cytospin-Zentrifuge (Cytospin3)	SHANDON
Elektrophorese-Kammer	BIO RAD
ELISA-Reader (anthos ht2)	Anthos Mikrosysteme
Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss
Multikanal-Pipette (Transferpette-8, 20-200 μL)	BRAND
Multistep-Pipetten (diverse)	Eppendorf, Ritter
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik
Lichtmikroskop	Leica
pH-Meter	WTW
Pipetten (min. 0,1 μL bis max. 1000 μL)	Eppendorf
Pipettierhilfen (diverse)	Integra Biosciences,
	Hirschmann-Laborgeräte
Photokassetten (Hypercassette)	Amersham
Semi-Dry-Blot-Gerät (Trans-Blot semi-dry)	BIO RAD
Sterilbank/Laminar-Flow-Box	Integra Biosciences
(Technoflow 3F120-II GS)	
Stickstofftank (Cryo 2000)	Thermo Scientific
Schüttler (diverse)	Heidolph, Edmund Bühler,
	Benchmark Research Products
Thermo-Inkubator	INFORS-AG
Thermo-Mixer 5436	Eppendorf
Ultraschallprozessor/Laborhomogenisator (UP 50H)	Dr. Hielscher GmbH
Umkehrmikroskop	Leica
Vortexer (diverse)	Heidolph, Scientific Industries
Wasserbad (SW-21C)	Julabo
Zentrifugen (diverse)	Heraeus

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
12/24/96-Well-Platten (steril)	BD Falcon
96-Well-Platten (unsteril)	NUNC
Filterpapier (Extra Thick Blotpaper)	BIO RAD
Filme (BioMax Light Film)	Kodak
Mikrozentrifugen-Gefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL)	Eppendorf, SARSTEDT
Multi-Pipetten-Spitzen (2,5 mL; 5 mL)	Eppendorf, Ritter
Petrischalen (100 x 20 mm)	BD Falcon
Pipettenspitzen (10 μL; 20 μL; 200 μL; 1000 μL)	Eppendorf, SARSTEDT
PVDF-Membranen (ImmunBlot)	BIO RAD
Serologische Pipetten (steril; 25 mL; 10 mL; 5mL; 2mL)	SARSTEDT
Serologische Pipetten (unsteril; 25 mL; 10 mL; 5mL)	SARSTEDT
Zellkultur-Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	BD Falcon
Zell-Schaber (diverse)	TPP, Corning Incorporated
Zentrifugenröhrchen (15 mL; 50 mL)	BD Falcon

3.1.3 Substanzen, Medien und Chemikalien

Substanzen	Lagerung	Hersteller
9-cis-Retinoat	gelöst in Ethanol in einer Konzentration von 10 μΜ,	Sigma-Aldrich
all-trans-Retinoat	Lagerung bei -80°C in Aliquots zu je 10 μL	Sigma-Aldrich
rhTRAIL	gelöst in sterilem PBS in einer Konzentration von	R&D-Systems
	50 μg/mL,	
	Lagerung bei -80°C in Aliquots zu je 10 μL	
Z-VAD-FMK	gelöst in DMSO in einer Konzentration von 20 mM,	Promega
	Lagerung bei -20°C als Aliquot à 125 μL	

Medien und Chemikalien	Hersteller	
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich	
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	
APS	SERVA	
Bromphenolblau	MERCK	
Complete Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor	Roche	
BSA	AppliChem	
DMSO	Sigma-Aldrich	
DMEM	Biochrom AG	
DTT	Sigma-Aldrich	
Entwickler	Kodak	
Ethanol 96%	Dr. K. Hollborn & Söhne	
Fixierer	Kodak	
Formalin Solution 10%	Sigma-Aldrich	
FCS	Gibco/Invitrogen	
Glycerin	Sigma-Aldrich, ROTH	
Glycin	MERCK	
L-Glutamin	Biochrom AG	
HCI	MERCK	
McCoy's 5A	Gibco/Invitrogen	
MEGM	Lonza	
Methanol	MERCK	
Natrium-Citrat	Sigma-Aldrich	
Natrium-Chlorid	Sigma-Aldrich	
Non-fat dry milk	BIO RAD	
Paraformaldehyd	SERVA	
PhosphoSafe Extraction Buffer	Novagen	
Ponceau S Solution (in 5% Essigsäure)	Sigma-Aldrich	
Precision plus – Protein-Marker	BIO RAD	
P/S	PAA; Biochrom AG	
PBS, Dulbecco's (steril, 500 mL)	PAA	

PBS, Dulbecco's (Pulver für 10 L)	Biochrom AG
Rotiphorese Gel 40	ROTH
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen
Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Millipore
SDS	ROTH
"SingleQuots"-Zellkultur-Supplemente	Lonza
TEMED	ROTH
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PAA
Tween 20	Sigma-Aldrich

3.1.4 Puffer, Lösungen und Gele

Blockpuffer	5% non-fat dry milk in PBS-Tween 0,05%	
Elektrophorese-Puffer 10x	125 mM Tris-Base	
	960 mM Glycin	
	4 mM SDS	
	Aqua dest.	
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd in <i>PBS</i>	
Ladepuffer 4x	250 mM Tris-HCl (pH 6,8)	
	40% Glycerin	
	8% SDS	
	16% DTT	
	0,4% Bromphenolblau	
	vor Gebrauch + 20% β-Mercaptoethanol	
MTT I	5mg/mL 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-	
	tetrazoliumbromid in PBS, Sterilfiltration	
MTT II	10% SDS in 0,01 M HCI	
<i>PBS</i> -Tween 0,05%, 2L	1 mL Tween-20 auf 2 L PBS	
Permeabilisierungslösung	0,1% Triton-X-100; 0,1% Natriumcitrat	

Sammelgel 4%, 5 mL	3,2 mL Aqua dest.						
	0,5 mL Rotiphorese Gel 40						
	1,25 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8						
	50 μL 10% SDS						
	50 μL 10% APS						
	10 μL TEMED						
SDS 2x	0,2 mL 0,5 M Tris-HCl						
	8 mL 10% SDS						
	2 mL Glycerin						
	Aqua dest. auf 20 mL						
Transferpuffer 10x	30,3 g Tris-Base						
	144 g Glycin						
	10 g SDS/0g SDS (mit/ohne SDS)						
	Aqua dest. auf 1 L						
Trenngel 10/12 %, 10 mL	4,8/4,3 mL Aqua dest.						
	2,5/3,0 mL Rotiphorese Gel 40						
	2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8						
	100 μL 10% SDS						
	50 μL 10% APS						
	5 μL TEMED						

3.1.5 Antikörper

	ino per				
	Produktname	Hersteller		ıngsfaktor	
			ECL ^{Plus}	ECL ^{Advance}	
	Actin (I-19)	SANTA CRUZ	1:1000	1:5000	
	(sc-1616)	BIOTECHNOLOGY	1.1000	1:10000	
	Bak (G-23)	SANTA CRUZ	1:500	-	
	(sc-832)	BIOTECHNOLOGY	1.500		
	<i>Bax</i> (N-20)	SANTA CRUZ	1:500	_	
	(sc-493)	BIOTECHNOLOGY	1.500		
	Bid	Cell Signaling	1:2000	-	
	(#2002)	TECHNOLOGY	1.2000		
	Bcl-2	Cell Signaling	1:2000	_	
	(#2870)	TECHNOLOGY	1.2000		
	cIAP1 (H-83)	SANTA CRUZ	1:250	1:2500	
	(sc-7943)	BIOTECHNOLOGY	1.200		
Primär-	Cleaved Caspase-3	Cell Signaling	_	1:1000	
Antikörper	(#9664)	TECHNOLOGY		1:2000	
	Cleaved Caspase-9	Cell Signaling	_	1:1000	
	(#9501)	TECHNOLOGY			
	DR5	ProSci	1:500	_	
	(#2019)		1:1000		
	DR4 (H-130)	SANTA CRUZ	1:500	-	
	(sc-7863)	BIOTECHNOLOGY			
	FLIP (N-TERMINAL)	Sigma-Aldrich	1:500	1:5000	
	(F9800)		1:1000		
	<i>McI-1</i> (S-19)	SANTA CRUZ	1:500	-	
	(sc-819)	BIOTECHNOLOGY			
	Survivin (FL-142)	SANTA CRUZ	1:250	1:5000 1:10000	
	(sc-10811)	BIOTECHNOLOGY	1:500		
	donkey anti-goat IgG-HRP	SANTA CRUZ	1:5000		
Sekundär-	(sc-2020)	BIOTECHNOLOGY	1.0000		
	goat anti-rabbit IgG-HRP	SANTA CRUZ	1:4000	1:10000	
	(sc-2004)	BIOTECHNOLOGY	1.1000		
Antikörper	donkey anti-rabbit IgG-HRP	SANTA CRUZ	1:4000	1:30000	
	(sc-2313)	BIOTECHNOLOGY	1.4000		
	anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling	_	1:10000	
	(#7074)	TECHNOLOGY		1.10000	

3.1.6 Handelsübliche Reaktions-Kits

BCA Protein Assay Kit (Pierce)	Thermo Scientific
Caspase 3/8/9-Activity-Assay-Kits	Millipore
Cell Death Detection ELISA PLUS	Roche
ECL Plus	GE Healthcare (Amersham)
ECL Advance	GE Healthcare (Amersham)
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche
MycoAlert mycoplasma detection kit	Lonza
Quick-Färbung	MERCK

3.1.7 Software zur Datenauswertung und -modellierung

CalcuSyn (Version 2.1)	Biosoft				
WinRead (Version 2.3)	Anthos Mikrosysteme				

3.2 Zelllinien und Zellkultur

3.2.1 Charakteristika und Herkunft der Zellen

Voraussetzung für die Bearbeitung der Fragestellung anhand der Untersuchung standardisierter in-vitro-Modelle ist deren Expression von *DR*'s, *RAR* und *RXR*. Tabelle 2 listet die zu diesem Zweck angewandten Tumorzell-Linien auf.

Zelltyp	Zelllinie	М	DR		RAR			RXR		7	Gewebe-spezifische	
			4	5	α	β	γ	α	β	γ	Charakteristika	
	MCF-7	ep/lu	+	+	+	0	+	+	+	0	ER+, HER-2/neu	
	T-47D	ep/lu	+	+	+	0	+	+	+	0	ER+, HER-2/neu ↓	
	ZR-75-1	ep/lu	+	+	+	+		+			ER+, HER-2/neu ↓	
Mamma-	SK-BR-3	ep/lu	+	+	+	0	+	+			ER−, HER-2/neu ↑	
karzinom	BT-474	ep/lu	+	+	+	0	+				ER+, HER-2/neu ↑	
	BT-20	ep/ba	+	0	+	0	+	+	+	0	ER−, HER-2/neu ‡	
	MDA-MB-231	mes	+	+	0	+	+	+			ER−, HER-2/neu ‡	
	MDA-MB-436	mes	+	+							ER−, HER-2/neu ‡	
Brust- drüse	MCF 10A	ep/ba	+	+	+			+			ER-, HER-2/neu -	
Osteo-	Saos-2	ер	+	+	+	+	+	+	+	0	HER-2/neu +	
sarkom	MG-63	fib	+	+	+	+	+	+	+	+	HER-2/neu +	
Knochen	primäre Osteoblasten		unbekannt									

Tabelle 2. Charakteristika verwendeter Zelllinien. M - Morphologie, ep - epithelial, lu - luminal, ba - basal, mes – mesenchymal, fib - fibroblastisch, ER - Estrogen-Rezeptor α, HER-2/neu - humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; +...wird exprimiert, +...wird stark exprimiert, − ... wird nicht exprimiert, ∘... Expression unterhalb der Nachweisgrenze, ‡...wird in normalem Umfang exprimiert, ↑...wird infolge einer Gen-Amplifikation überexprimiert, leere Felder...keine bzw. keine eindeutige Angabe verfügbar. Vorgenannte Angaben wurden den Referenzen [39, 55, 57, 90, 94, 137-145] sowie den entsprechenden *ATCC*-Datenblättern entnommen.

Die Zelllinien MCF-7, T-47D, ZR-75-1, SK-BR-3, BT-474, BT-20, MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF 10A waren über die ATCC (American Type Culture Collection) erhältlich. Osteosarkomzellen und primäre Osteoblasten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Maren Mieth aus der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Sezer zur Verfügung gestellt: die Zelllinien Saos-2 und MG-63 entstammten dem Zellkulturbestand der ATCC und DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen); die Osteoblasten wurden durch Kultivierung trabekulärer Knochenfragmente unter sterilen Bedingungen gewonnen.

3.2.2 Zellkultivierung

MCF-7-, T-47D-, ZR-75-1-, BT-474-, BT-20-, MDA-MB-231- und MDA-MB-436-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10% FCS und 1% P/S; SK-BR-3- und Saos-2-Zellen in McCoy's 5A-Medium unter Zusatz von 10% FCS, 1% P/S und 2 mmol/L Glutamin; MG-63-Zellen in DMEM (low glucose) unter Zusatz von 10% FCS, 1% P/S sowie 2 mmol/L Glutamin und MCF 10A-Zellen in MEGM unter Zusatz von 20% FCS, 4 mmol/L Glutamin sowie der im entsprechenden ATCC-Datenblatt empfohlenen Supplemente ("SingleQuots": 52µg/mL bovinem Hypophysen-Extrakt, 0,5 μg/mL Hydrocortison, 10ng/mL humanem epidermalem Wachstumsfaktor, 5μg/mL Insulin, Gentamycin-AmphotericinB-1000-Mix) kultiviert. Alle Zelllinien sind adhärent und wurden als Suspensionskultur unter sterilen Bedingungen in geeigneten Kulturflaschen herangezüchtet und in Brutschränken bei H₂O-gesättigter Atmosphäre, 5% CO₂ und 37°C aufbewahrt. Voraussetzung für die Durchführung der jeweiligen Versuchsreihen war zudem ein negativer Mycoplasmentest. Mediumwechsel wurden je nach Zelllinie, Zelldichte und Verdopplungsrate alle zwei bis sechs Tage durchgeführt. In dieser Frequenz erfolgte auch die regelmäßige Subkultivierung (Passage) im Verhältnis 1:2 bis 1:20. Die Inkubation in Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C diente hierbei der Ablösung der Zellen vom Kulturflaschen-Boden. Die Zellzahlbestimmung im Rahmen des Erntens der Zellen bzw. deren Subkultivierung erfolgte durch Anfärbung mittels Trypanblau und anschließendes standardisiertes Auszählen anhand einer Neubauer-Zählkammer am Lichtmikroskop.

3.2.3 Langfristige Aufbewahrung von Aligouts

Von jeder Zelllinie wurden zu Zeitpunkten möglichst früher Passagen mehrere Aliquots zum Zweck der Weiterkultivierung für zukünftige Experimente angelegt und in Flüssigstickstoff dauerhaft gelagert. Das erforderliche Einfrier-Medium beinhaltete 5-10% DMSO, 20% *FCS* sowie 70-75% der jeweiligen Standard-Kultursuspension. Bei Überschreiten der 30. Passage wurden die entsprechenden Kulturen verworfen und bei Bedarf aus oben genanntem Bestand neu angelegt.

3.3 MTT-Test – Bestimmung der Zellviabilität

3.3.1 Prinzip

Der MTT-Test quantifiziert die Viabilität einer Zellpopulation anhand der Aktivität enzymatischer Redoxreaktionen im Rahmen zellulärer Stoffwechselprozesse. Dies

ermöglicht einen Vergleich der Überlebensfähigkeiten verschiedenen behandelter Proben jener Zellpopulation untereinander sowie mit unbehandelten Kontrollen. Während der Inkubation der jeweiligen Proben mit einem gelösten Tetrazolium-Salz gelblicher Färbung (MTT I-Reagenz) wird dieses vorrangig durch Reaktion mit zellulären Reduktionsäquivalenten zu einer violett gefärbten kristallinen Formazan-Verbindung umgesetzt. Die intrazellulär ausgefällten Formazan-Kristalle gehen nach anschließender Zugabe eines Detergens (MTT II-Reagenz) in Lösung, deren Violettfärbung, die als optische Dichte photometrisch bei 512 nm gemessen wird, als semiguantitatives Maß für die Zellviabilität dient.

3.3.2 Durchführung

Im Rahmen der oben beschriebenen Subkultivierung wurde je nach Zelllinie eine Suspension von 4 x 10⁴ bis 8 x 10⁴ Zellen pro mL Kulturmedium hergestellt, von der jeweils 100 µL in die Vertiefungen von 96-Well-Platten pipettiert wurden, sodass jedes Well 4000 - 8000 Zellen enthielt. Nach einem 24-stündigen Intervall zum Zweck der Adhärenz wurde das Kultur-Medium aus den Wells entfernt und die Zelllage einmalig mit PBS gewaschen. Parallel erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe der auf ihre Effekte zu untersuchenden Substanzen in frischem Zellkulturmedium. In jedes Well einer Probe wurden 100 µL der jeweiligen Verdünnung sowie in die Kontroll-Wells 100 µL reinen Kulturmediums pipettiert. Hierbei wurden sämtliche Proben und Kontrollen 6fach angelegt. Es schloss sich je nach Zelllinie eine vier- bis fünftägige Inkubationszeit an, nach deren Ablauf das Medium eines jeden Wells nochmals nach einem Wasch-Schritt mit PBS durch 100 µL frisches Kultur-Medium ersetzt und pro Well 10 µL MTT I-Reagenz hinzugegeben wurde. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurden je Well 100 µL MTT II-Reagenz hinzugefügt. Das zur Lösung der Formazan-Kristalle erforderliche Intervall betrug mindestens 24 h, nach dessen Ablauf am ELISA-Reader die optische Dichte der Proben bei 512 nm gemessen wurde. Von jedem Messwert wurde der durchschnittliche Blank-Wert, die optische Dichte allein des Kulturmediums und der MTT-Reagenzien (ohne Zellen), subtrahiert. Die Zellviabilität jeder Probe errechnete sich aus dem Quotienten des arithmetischen Mittels ihrer sechs OD-Werte und des arithmetischen Mittels der sechs OD-Werte der Kontrolle.

3.4 *Clonogenic Assay* – Untersuchung der Kolonieformationspotenz von Einzelzellen

3.4.1 Prinzip

Der Clonogenic Assay dient der Unterscheidung zytotoxischer von zytostatischen Wirkungen Wachstums-inhibierender Einflüsse auf eine Kolonie-bildende Zellpopulation. Dies setzt das initiale Vorliegen einer standardisierten Anzahl von Einzelzellen voraus, die während der Inkubationszeit in Gegenwart jener Faktoren eine bestimmte Anzahl von Kolonien einer bestimmten Größe formieren. Weist die Probe nach abgelaufener Einwirkzeit und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weniger Kolonien auf, kann dies Folge des Untergangs initial vorhandener Zellen sein: die Faktoren wirkten demnach zytotoxisch. Sind die resultierenden Kolonien hingegen lediglich kleiner als die der Kontrolle, ist ein zytostatischer Effekt anzunehmen. Häufig treten auch beide Phänomene kombiniert auf [146].

3.4.2 Durchführung

Von einer Suspension, die je nach Zelllinie 400 bis 7000 Zellen pro mL Kulturmedium enthielt, wurde jeweils 1 mL in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte pipettiert. Nach einem 24- bis 72-stündigen Intervall zum Zweck der Adhärenz wurde das Kultur-Medium aus den Wells entfernt und die Zelllage einmalig mit PBS gewaschen. Parallel erfolgte die Herstellung von Substanzverdünnungen in Kulturmedium für die Behandlung der Zellen: die Probe-Wells wurden mit 1 mL der jeweiligen Verdünnung, die Kontroll-Wells mit 1 mL reinen Kulturmediums versehen. Der Behandlungszeitraum betrug entweder sieben oder vierzehn Tage. Während der vierzehntägigen Inkubation erfolgte gemäß vorgenannter Anleitung nach sieben Tagen ein Mediumwechsel sowie erneute Behandlung der Proben. Die sich der Gesamt-Inkubationszeit anschließende Quick-Färbung diente sowohl der Beurteilung der Kolonie-Anzahl und -Größe am Umkehrmikroskop, als auch der fotografischen Dokumentation der Ergebnisse.

3.5 TUNEL-Assay - Nachweis der Fragmentierung nukleärer DNA

3.5.1 Prinzip

Im Rahmen der Apoptose-Induktion führt die Aktivität *Caspase*-abhängiger *DNAse* zur Fragmentierung des Chromatins im Zellkern. Die hierdurch an den 3´-Enden der Monobzw. Oligonukleosomen und Einzelstrangbrüche exponierten Hydroxylgruppen können über eine terminale Desoxynukleotidyl-Transferase mit Fluorescein-konjugierten dUTP-Einheiten markiert und anschließend detektiert werden: die Intensität der Fluoreszenz gibt hierbei das Ausmaß nukleärer *DNA*-Fragmentierung als molekularbiologisches Korrelat der Apoptose-Induktion wieder.

3.5.2 Durchführung

Von einer im Rahmen der Subkultivierung hergestellten Suspension à 3,5 x 10⁵ Zellen pro mL Kulturmedium wurde jeweils 1 mL in die Vertiefungen einer 12-Well-Platte pipettiert. Nach einem 24-stündigen Intervall zum Zweck der Adhärenz wurde das Kultur-Medium aus den Wells entfernt und die Zelllage einmalig mit PBS gewaschen. Parallel erfolgte die Herstellung von Substanzverdünnungen in Kulturmedium für die anschließende Inkubation. Die Probe-Wells wurden mit 1 mL der jeweiligen Verdünnung, die Kontroll-Wells mit 1 mL reinem Kulturmedium versehen. Nach 24stündiger Inkubationszeit wurden die Zellpopulationsproben einzeln geerntet und nach Zellzahlbestimmung Aliquots von 6000 Zellen je Probe in je 200 µL Medium angelegt. Zum Zweck des Aufbringens jener standardisierten Anzahl von Zellen einer Probe auf jeweils zwei Objektträger kam das Cytospin-Verfahren zur Anwendung. Die Luftgetrockneten Proben wurden anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur in frischer Fixierlösung inkubiert, mit PBS gewaschen und für die folgenden Schritte in einer feuchten Kammer auf Eis zwischengelagert. Nach zweiminütiger Behandlung der Proben mit eiskalter Permeabilisierungslösung erfolgten wiederum zwei Wasch-Schritte mit PBS. Zur enzymatischen Markierung der Hydroxylgruppen freier 3'-DNA-Enden wurde das In Situ Cell Death Detection Kit der Firma Roche den Hersteller-Angaben entsprechend genutzt. Die Auswertung der DNA-Fragmentierung in den Zellkernen der Proben sowie einer im Vorfeld mit DNAse inkubierten Positiv-Kontrolle erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Detektionswellenlänge von 515 bis 565 nm.

3.6 *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* – Nachweis von Nukleosomen im Zytoplasma

3.6.1 Prinzip

Zum Zweck der Verifizierung der Ergebnisse des TUNEL-Assay kam ein Verfahren zur Detektion zytoplasmatischer Nukleosomen, der Cell-Death-Detection-ELISA^{PLUS}, zur Anwendung, der auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay basiert: die Streptavidin-Beschichtung einer Mikrotiterplatte bindet hierbei Biotinanti-Histon-Antikörper, die Nukleosomen gekoppelte einer Analysen-Probe immobilisieren. Deren Detektion erfolgt nunmehr über die Bindung Zugabe Meerrettichperoxidase-konjugierter anti-DNA-Antikörper durch eines Meerrettichperoxidase-spezifischen Substrates, dessen Umsetzung eine photometrisch messbare Farbreaktion initiiert.

3.6.2 Durchführung

SK-BR-3-Zellen wurden in einer Dichte von 5000 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und nach 24 h Adhärenzzeit wie im Punkt 2.3. beschrieben behandelt. Zur Normierung der Zellzahlen der behandelten Proben nach viertägiger Inkubation wurde parallel und unter gleichen Bedingungen ein MTT-Test mitgeführt. Proben und Kontrollen für den ELISA wurden als Duplikate, für den MTT-Test sechsfach angelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Normierungs-MTT-Test gemäß den Erläuterungen in Punkt 2.3. ausgewertet. Die für den ELISA vorgesehene 96-Well-Platte wurde zum Zweck der Sedimentation fluktuierender Zellen zunächst zentrifugiert. Der Entfernung der Medium-Überstände schloss sich die Resuspension der Zellpellets in je 50 µL Lysepuffer sowie ein 30-minütiges Inkubationsintervall an. Die auf diese Weise gewonnenen Zell-Lysate wurden durch Zentrifugation in je ein Zellkern-Pellet und den Zytoplasma-Überstand aufgetrennt. Jeweils 20 µL jener Überstande sowie 20 μL Inkubationspuffer als Background-Kontrolle und 20 μL einer Assay-internen DNA-Histon-Komplexe enthaltenden Positiv-Kontrolle wurden folglich in die Wells einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Hinzufügen von 80 µL des die oben genannten Antikörper enthaltenden Immunreagenz und Abdecken der Wells mit Folie erfolgte bei Raumtemperatur zunächst die zweistündige Inkubation auf einem Schüttler und anschließend die Entfernung jeglicher Flüssigkeit aus den Wells sowie das dreimalige Waschen mit je 250 µL Inkubationspuffer. Die leeren Wells wurden

folglich mit je 100 µL einer zwischenzeitlich gemäß Hersteller-Protokoll erstellten Substratlösung versehen. Nach 20- bis 25-minütiger Inkubation auf einem Schüttler erfolgte die Zugabe von 100 µL einer die Farbreaktion arretierenden Stop Solution. Abschließend wurden die optischen Dichten der Analysenproben auf der Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels ELISA-Reader bestimmt. Zur Auswertung erfolgte zunächst die Subtraktion des durchschnittlichen Blank-Wertes der mit Substratlösung und Stop Solution versetzten Background-Kontrolle (ohne Zellen) – von jedem OD-Wert jeder Probe. Schließlich errechnete sich der sogenannte Anreicherungsfaktor, der die Nukleosomen-Akkumulation im Zytoplasma einer Probe relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) wiedergibt, entsprechend aus dem Quotienten des gemittelten OD-Wertes einer Probe und des gemittelten OD-Wertes der Kontrolle. Da sich womöglich – abhängig von der Behandlung – während des Inkubationsintervalls zwischen einzelnen Proben Differenzen der Zellzahlen ergeben haben, wurde der Anreicherungsfaktor jeder Probe bzw. der Kontrolle mittels Division durch den zugehörigen relativen MTT-Wert normalisiert.

3.7 Western Blot

3.7.1 Prinzip

Der Western Blot ist ein semiquantitatives Verfahren zur Detektion von Proteinen, das Expressionsgrades Vergleich des beliebiger Genprodukte verschiedenen Zellkulturproben auf Translationsund Posttranslations-Ebene ermöglicht. Die in den Lysaten repräsentativer Proben einer Zellpopulation befindlichen Proteine werden hierbei nach Molekülmasse elektrophoretisch und in vertikaler Richtung in einem Polyacrylamid-Gel separiert. Anschließend erfolgt durch Anlegen einer elektrischen Spannung der horizontale Transfer vom Gel auf einen permanenten Träger, beispielsweise auf eine PVDF-Membran. Diese wird zunächst mit einem primären, für das interessierende Protein spezifischen sowie nachfolgend mit einem sekundären, den primären bindenden und an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper, inkubiert. Die Zugabe eines geeigneten Substrats initiiert schließlich eine Meerrettichperoxidase-katalysierte Chemilumineszenz, deren Intensität als relatives Maß der Proteinmenge dient.

3.7.2 Durchführung

3.7.2.1 Behandlung der Tumorzellen und Proteinisolierung

SK-BR-3- bzw. Saos-2-Zell-Suspensionen wurden in einer Dichte von 0,3 x 10⁵ bis 1,0 x 10⁵ Zellen pro mL Kulturmedium zu je 10 mL in je 10 cm durchmessende Petrischalen überführt und bis zu einer Zell-Konfluenz von 85% ca. drei bis sieben Tage kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums und einem Wasch-Schritt mit PBS wurden die hinsichtlich ihres Einflusses auf den Proteinbestand der Zellen zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen frischem Medium beigefügt. Jede Probe wurde mit 10 mL einer Substanzverdünnung bzw. jede Kontrolle mit 10 mL reinem Kulturmedium vier bis fünf Tage inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums sowie einem Wasch-Schritt in eiskaltem PBS und unter Zuhilfenahme eines Zellschabers vom Petrischalenboden gelöst. Jede Probe wurde folglich in je ein auf Eis vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt, bei 4°C herunterzentrifugiert, nach Dekantieren des Überstandes erneut in eiskaltem PBS resuspendiert, erneut bei 4°C zentrifugiert, nach Entfernen des Überstandes in 90% 10% Complete-Protease-Inhibitor resuspendiert, PhosphoSafe-Lysepuffer und gevortext und ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte mittels eines Ultraschall-Homogenisators die Sonifizierung der Proben auf Eis. Nach Herunterzentrifugation des Zelldebris wurden die Proteinlysat-Überstände in neue Mikrozentrifugengefäße überführt und bei -80°C gelagert.

3.7.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung der gewonnenen Lysate wurden aus je 2 μL einer Probe und 98 μL *PBS* 1:50-Verdünnungen hergestellt, für deren weitere Aufbereitung das *BCA-Protein-Assay-Kit* dem Protokoll des Herstellers entsprechend zur Anwendung kam. Die Proteinkonzentration einer jeden Probe wurde aus deren am *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessenen optischen Dichte ermittelt. Grundlage hierfür war eine Standardkurve, die die optischen Dichten mitgeführter Proben bekannter Proteinkonzentrationen wiedergab.

3.7.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und *Blot*-Verfahren

Das im Vorfeld erfolgte Probenaufbereitungsverfahren diente insbesondere dem Zweck einer Struktur-Standardisierung enthaltener Proteine, sodass deren Wanderungsverhalten während der sich anschließenden Elektrophorese lediglich durch

Molekülmasse und Anzahl der Ladungen bestimmt wurde. Hierbei bedingten der Zusatz von SDS die Maskierung Protein-eigener durch negative Ladungen, der Zusatz von β-Mercaptoethanol die Reduktion der Disulfidbrücken zu freien Thiolen und die zehnminütige Inkubation bei 95°C die Hitze-Denaturierung. Nach Aufbereitung wurden je Probe 50 μg Protein in je 10 μL Ladepuffer auf ein Zwei-Komponenten-Gel aufgetragen, das aus einem Sammelgel (4% Acrylamid) und einem Trenngel (10% bzw. 12% Acrylamid) bestand. Die zusätzliche Mitführung eines Standard-Markers ermöglichte hierbei die spätere Überprüfung der Masse des detektierten Proteins auf Plausibilität hinsichtlich dessen Identität. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt über einen Zeitraum von 70-90 min. Folglich wurde eine PVDF-Membran ca. eine Minute in Methanol und anschließend gemeinsam mit Filterpapieren und dem nun Protein-beladenen Trenngel mindestens zehn Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Auf die basale Kontaktfläche der Semidry-Blot-Apparatur wurde nun das untere, Transferpuffer-getränkte Filterpapier, auf dieses die PVDF-Membran, darüber das Trenngel und oben auf ein weiteres Transferpuffer-getränktes Filterpapier platziert, das Kontakt zum Verschlussdeckel des Gerätes bot. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im Semidry-Verfahren bei 15 Volt über einen Zeitraum von 45-70 min auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Verifizierung des Erfolges des Blot-Vorgangs diente die transiente Anfärbung der Membran-gebundenen Proteine in Ponceau-S-Lösung, deren Rückstände in mehreren Wasch-Schritten mit PBS-T entfernt wurden.

3.7.2.4 Inkubation mit Antikörpern und Detektion

Nach ein- bis zweistündiger Inkubation der PVDF-Membran in Blockpuffer erfolgte über Nacht und bei 4°C auf einem Schüttler deren Behandlung mit dem ebenfalls in Blockpuffer gelösten Primär-Antikörper. Nach viermaligem je zehnminütigen Waschen in *PBS*-T wurde die PVDF-Membran 1,5 h mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper in 1% non-fat dry milk/PBS-T inkubiert. Im Anschluss an vier erneute zehnminütige Wasch-Schritte erfolgte gemäß Hersteller-Protokoll die Visualisierung der zu detektierenden Protein-Banden mittels *ECL*-Reagenz. Das nach dem Prinzip der Chemilumineszenz entstandene Signal wurde auf handelsüblichen lichtempfindlichen Filmen festgehalten. Die anschließende 15- bis 25-minütige Inkubation der PVDF-Membran in 1:10 mit Aqua dest. verdünnter Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution führte zur Entfernung der Antikörper sowie des *ECL*-

Reagenz. Dies ermöglichte eine Wiederverwendung jenes Proteinträgers zur Detektion weiterer Proteine, sodass nach drei abschließenden fünfminütigen Wasch-Schritten abermals gemäß dem in diesem Abschnitt beschriebenen Algorithmus verfahren werden konnte. Protein-tragende PVDF-Membranen wurden bis zum Gebrauch bei 4°C in *PBS*-T gelagert und nach drei- bis viermaliger Detektion verworfen.

3.8 Caspase-Activity-Assay

3.8.1 Prinzip

Die Bestimmung der Aktivität diverser *Caspasen* in der zytoplasmatischen Fraktion lysierter Zellproben anhand des oben genannten *Assay*-Kits basiert auf der quantitativen photometrischen Detektion des chromogenen Spaltproduktes eines *Caspase*-Substrates.

3.8.2 Durchführung

Von SK-BR-3- bzw. Saos-2-Zell-Suspensionen einer Konzentration von 5 x 10⁴ Zellen pro mL Kulturmedium wurden je Probe 20 mL in jeweils 10 cm durchmessende Petrischalen überführt. Einer 24-stündigen Adhärenzzeit folgte die Behandlung der Zellen gemäß den Erläuterungen in Punkt 2.7.1. Nach viertägiger Inkubation wurden die Zellen durch Trypsinieren vom Petrischalen-Boden gelöst sowie mittels Trypanblau-Färbung die Zellzahlen sämtlicher Proben bestimmt. Anschließend wurden Aliquots von je Probe 1,7 x 10⁶ (SK-BR-3) bzw. 1,0 x 10⁶ (Saos-2) Zellen hergestellt. Nach Medium-Überstandes Abzentrifugation des wurden den Hersteller-Angaben entsprechend die Zellpellets lysiert sowie deren Zytosol-Überstände aufbereitet, in 96-Well-Platten überführt und mit Caspase-Substrat inkubiert. Als Kontrollen wurden eine unbehandelte sowie eine vor Zugabe des Caspase-Substrates mit einem Caspase-Inhibitor versetzte Probe mitgeführt. Jeder Reaktions-Ansatz Doppelbestimmung angelegt. Die Quantifizierung des durch zytoplasmatische Caspase-Aktivität aus dem zugegebenen Substrat freigesetzten chromogenen Spaltproduktes erfolgte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die optischen Dichten der Proben wurden gemäß Hersteller-Protokoll um den durchschnittlichen Blank-Wert (Substrate Blank) vermindert und anschließend gemittelt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich – abhängig von der Behandlung – während des Inkubationsintervalls zwischen einzelnen Proben Differenzen des Gesamt-Protein-Bestandes eingestellt haben, wurde mittels des BCA-Protein-Assay-Kit jeweils die

Gesamt-Protein-Konzentration der gewonnenen Zytoplasma-Überstände bestimmt. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der *Caspase*-Aktivitäten einzelner Proben untereinander wurden diese durch den zugehörigen Gesamt-Proteinkonzentrationswert dividiert.

3.9 Statistische Auswertung

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden in ein bis zwei wiederholten und Experimenten reproduziert. Dargestellt unabhängigen ist jeweils genau repräsentatives Resultat. Die Standardabweichungen quantitativer Messpunkte wurden jeweils in Excel ermittelt und sind in allen unten stehenden Diagrammen angegeben. Zur Quantifizierung der anhand des MTT-Tests dargestellten Kombinationseffekte von TRAIL und Retinoiden auf die Viabilität der untersuchten Tumorzellen wurden mittels der CalcuSyn-Software sogenannte Kombinations-Indizes berechnet: Cl-Werte kleiner als Eins entsprachen hierbei einem synergistischen, CI-Werte gleich Eins einem additiven und CI-Werte größer als Eins einem antagonistischen Kombinationseffekt. Für die Behandlung der Tumorzellen musste hierbei gewährleistet sein, dass das Verhältnis der ansteigenden Konzentrationen beider Einzelsubstanzen an jedem Messpunkt konstant blieb [147, 148].

4 Ergebnisse

4.1 Abhängigkeit der Tumorzell-Responsivität gegenüber *TRAIL* und Retinoiden von Morphologie und Dignität der jeweiligen Zelllinie

Als Grundlage der Untersuchung von Kombinationseffekten auf die Tumorzell-Viabilität diente die Ermittlung der Sensitivitäten möglichst divers charakterisierter Zelllinien gegenüber TRAIL (siehe Abbildung 1) sowie gegenüber Retinoiden (siehe Abbildung 2) als Mono-Regime. Zu diesem Zweck wurden sowohl epitheliale und mesenchymale Tumorzelllinien als auch Zellinien benignen Ursprungs mit der angegebenen Substanz in ausgewiesener Konzentration inkubiert. Die sich anschließende Viabilitätsbestimmung diente der Exploration des Ausmaßes zytotoxischer Effekte in Abhängigkeit von Morphologie, Dignität und Entität der jeweiligen Zelllinie.

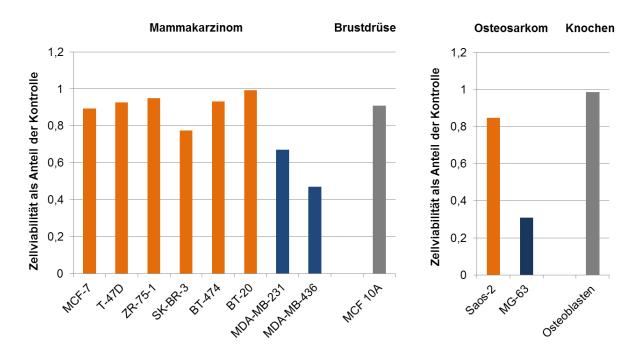


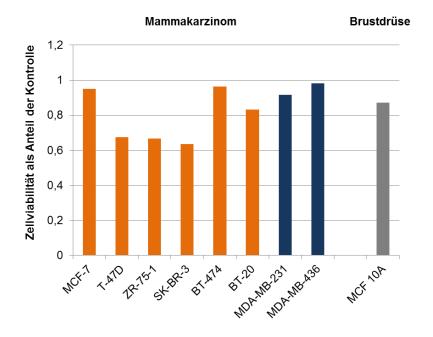
Abbildung 1: Relative Viabilitäten von Zelllinien malignen und benignen Ursprungs nach Behandlung mit *TRAIL*. Orangene Balken – Tumor-Zelllinien epithelialer Morphologie; Blaue Balken – Tumor-Zelllinien mesenchymaler Morphologie; Graue Balken – benigne Zelllinien. Nach vier- bzw. fünftägiger Inkubation der Zellen mit *TRAIL* in einer Konzentration von ca. 5,5 ng/mL wurde mittels MTT-Test deren Viabilität bestimmt.

Wie Abbildung 1 zeigt, wiesen die *triple-negativen* mesenchymalen Mammakarzinom-Zellinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 nach Behandlung mit *TRAIL* die größte Reduktion ihrer Viabilitäten auf. Die Viabilität der ebenfalls *triple-negativen*, aber epithelialen Mammakarzinom-Zelllinie BT-20 hingegen blieb bei gleicher

Substanzkonzentration und Inkubationsdauer unbeeinflusst. Während sich die ERα-positiven, epithelialen Vertreter MCF-7, T-47D und ZR-75-1 mit einer maximalen Inhibition von etwa 10% als relativ resistent erwiesen, zeigten die ebenfalls epithelialen, HER-2/neu-amplifizierenden Zelllinien unterschiedliche Responsivitäten: die Sensitivität der Tumorzellen vom Typ BT-474 war vergleichbar mit jener der ERα-positiven Vertreter, während sich SK-BR-3-Zellen mit einer Viabilitäts-Reduktion von mehr als 20% als moderat responsiv gegenüber *TRAIL* erwiesen. Die Suszeptibilität der nichtmalignen mammären Zelllinie MCF 10A entsprach jener der *TRAIL*-resistenten ERα-positiven Tumorzellen.

Weiterhin zeigten auch die untersuchten Osteosarkom-Zelllinien ähnliche TRAIL-Sensitivität jeweilgen Abhängigkeiten der vom Zelltyp: während mesenchymale Zelllinie MG-63 von allen untersuchten Zelllinien die größte Viabilitäts-Reduktion aufwies, erwiesen sich epitheliale Saos-2-Zellen als eher moderat sensitiv und benigne Osteoblasten als resistent.

Für die hier untersuchten Zelllinien lässt sich demnach unabhängig von der Entität festhalten, dass sich Tumorzellen mesenchymaler Morphologie sensitiver gegenüber *TRAIL*-induzierten zytotoxischen Effekten verhalten als Tumorzellen epithelialer Morphologie und Zelllinien benignen Ursprungs.



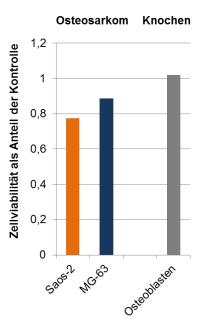


Abbildung 2: Relative Viabilitäten von Zelllinien malignen und benignen Ursprungs nach Behandlung mit atRA (linkes Diagramm) bzw. 9cisRA (rechtes Diagramm). Orangene Balken – Tumor-Zelllinien epithelialer Morphologie; Blaue Balken – Tumor-Zelllinien mesenchymaler Morphologie; Graue Balken – benigne Zelllinien. Nach vier- bzw. fünftägiger Inkubation der Zellen mit atRA bzw. 9cisRA in einer Konzentration von 110 nmol/L wurde mittels MTT-Test deren Viabilität bestimmt.

Die in Abbildung 2 dargestellten Zusammenhänge zwischen den Retinoid-Sensitivitäten der untersuchten Zelllinien und deren Morphologie sind hingegen komplexer: Die *TRAIL*-sensitiven mesenchymalen Tumorzelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MG-63 zeigten sich gegenüber Retinoiden relativ resistent. Die allenfalls geringfügig *TRAIL*-responsiven, ERα-positiven Mammakarzinom-Zelllinien T-47D und ZR-75-1 hingegen waren gegenüber Retinoiden eher sensitiv, MCF-7 eher resistent. Von den HER-2/neu-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellinien erwiesen sich BT-474 als resistent und SK-BR-3 als sensitiv. Die epitheliale, *triple-negative* Mammakarzinom-Zelllinie BT-20 sowie die epitheliale Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 zeigten geringfügige bis moderate Responsivität, während sich benigne MCF 10A-Zellen und Osteoblasten auch gegenüber Retinoiden eher resistent verhielten.

Die untersuchten Zelllinien ließen sich demnach bezüglich ihres Sensitivitätsverhaltens gegenüber *TRAIL* und Retinoiden wie folgt einteilen: die Gruppe der *TRAIL*-sensitiven und Retinoid-resistenten Zellen umfasste insbesondere die Tumorzelllinien mesenchymaler Abstammung MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MG-63. Zur Kategorie *TRAIL*-resistenter und Retinoid-sensitiver Zelllinien gehörten die ERα-exprimierenden epithelialen Zelllinien T-47D und ZR-75-1. Moderate Responsivität gegenüber beiden Substanzgruppen zeigten Tumorzellen vom Typ Saos-2 bzw. SK-BR-3. Als sowohl Retinoid- als auch *TRAIL*-resistent erwiesen sich schließlich die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und BT-474 sowie die benignen Zellen der Linie MCF 10A und primäre Osteoblasten.

4.2 Zelltyp-spezifischer Synergismus von *TRAIL* und Retinoiden in der Reduktion der Zellviabilität

Ziel der im Folgenden aufgeführten Untersuchungen war die Exploration eines Kombinationseffekts von TRAIL und Retinoiden auf die Viabilität der aufgeführten Tumorzelllinien sowie dessen eventuelle Korrelation mit oben genannten Kategorien der Phänotyp-Sensitivitäts-Beziehungen. Zu diesem Zweck wurde zunächst in mehreren MTT-Test-Reihen die sogenannte IC₅₀ bestimmt. Dieser jeweils Zelltyp- und Substanzspezifische Wert ist definiert als jene Substanzkonzentration, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Reduktion der Zellviabilität auf 50% bedingt. In Vorbereitung der Kombinationsstudien wurde hierauf basierend für jede der angeführten Zelllinien eine Reihe exponentiell wachsender Konzentrationen der Einzelsubstanzen so konstruiert, dass diese den IC_{50} -Wert bzw. – wenn nicht erreicht – die maximale applizierte Konzentration der höchsten Zellvitalitäts-Reduktion gerade noch einschloss. Die Relation einander entsprechender TRAIL- und Retinoid Konzentrationen war hierbei an jedem Messpunkt der Reihe konstant [147, 148]. Dem entsprechend verdeutlicht Abbildung 3 die Dosis-abhängige Reduktion der Viabilitäten von jeweils mit TRAIL und 9cisRA als Mono- sowie als Kombinations-Regime behandelten Mammakarzinom-Zellen vom Typ SK-BR-3 und Osteosarkom-Zellen vom Typ Saos-2. Analog hierzu zeigt Abbildung 4 die Vitalitätsverläufe der Mammakarzinom-Zelllinie BT-474 sowie der Osteosarkom-Zelllinie MG-63.

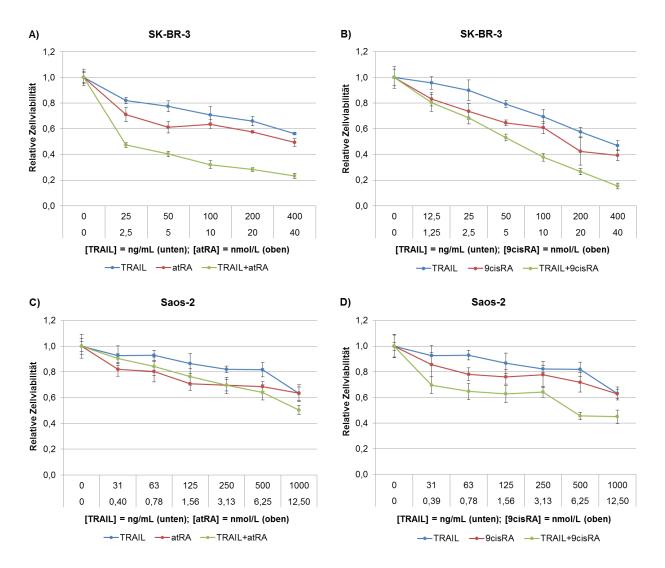


Abbildung 3. Relative Viabilitäten von Mammakarzinom-Zellen der Linie SK-BR-3 (A und B) und Osteosarkom-Zellen der Linie Saos-2 (C und D) in Abhängigkeit der Behandlung mit TRAIL, atRA bzw. 9cisRA sowie deren Kombination: nach fünftägiger Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von TRAIL, atRA bzw. 9cisRA allein sowie mit deren Kombination wurde mittels MTT-Test deren Viabilität bestimmt.

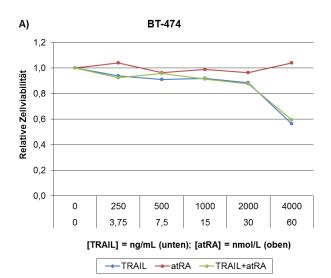
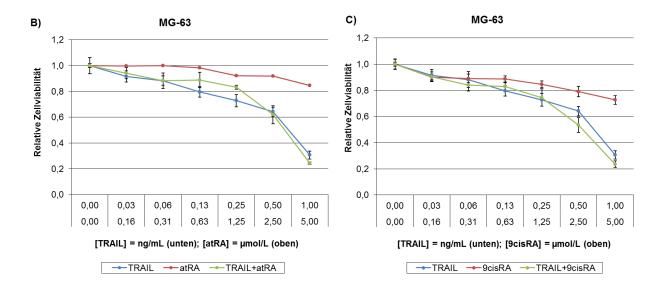


Abbildung 4. Relative Viabilitäten von Mammakarzinom-Zellen der Linie BT-474 (A) und Osteosarkom-Zellen der Linie MG-63 (B und C) in Abhängigkeit der Behandlung mit TRAIL, atRA bzw. 9cisRA sowie deren Kombination: nach sechsbzw. fünftägiger Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von TRAIL, atRA bzw. 9cisRA allein sowie mit deren Kombination wurde mittels MTT-Test deren Viabilität bestimmt.



Der aus dem Verlaufsvergleich jeweiliger Kurven der Mono-Regime (blau und rot) mit der entsprechenden Kurve des Kombinations-Regimes (grün) ersichtliche Kombinationseffekt wurde anhand Computer-gestützter Analysen quantifiziert: die Spalten 2, 3 und 4 der Tabelle 3 zeigen für jeweils ein repräsentatives Experiment die anhand der *CalcuSyn*-Software errechnete IC_{50} der jeweiligen Zelllinie für *TRAIL*, atRA oder 9cisRA, die Spalten 5 und 6 zeigen entsprechend die IC_{50} für die Kombination jener Einzelsubstanzen sowie den zugehörigen Kombinations-Index (CI_{IC50}).

10	TRAIL	atRA	9cisRA	TRAIL + a	tRA	TRAIL + 9cisRA			
<i>IC</i> ₅₀	$\left(\frac{ng}{mL}\right)$	$\left(\frac{nmol}{L}\right)$	$\left(\frac{nmol}{L}\right)$	$\left(\frac{ng}{mL}/\frac{nmol}{L}\right)$	CI _{IC50}	$\left(\frac{ng}{mL}/\frac{nmol}{L}\right)$	CI _{IC50}		
MCF-7	3187	6*10 ¹²	_	344 / 4300	0,1	-	_		
T-47D	462	3847	_	27 / 135 0,1		-	_		
ZR-75-1	86	67261	_	13 / 65	0,1	-	_		
SK-BR-3	28	454	161	2 / 20	0,1	6 / 60	0,6		
Saos-2	51	6412	8643	13 / 1040	0,4	7 / 560	0,2		
MG-63	3	2528	19907	3 / 600	1,3	2 / 400	0,8		

Tabelle 3. *IC*₅₀ für *TRAIL*, *atRA* bzw. *9cisRA* allein sowie für deren Kombination in Abhängigkeit der untersuchten Mammakarzinom- bzw. Osteosarkom-Zelllinie. Für jede Substanzkombination ist der für die *IC*₅₀ geltende *CI* angegeben. Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zellen wurden vier bis fünf Tage mit steigenden Konzentrationen von *TRAIL*, *atRA* bzw. *9cisRA* allein sowie mit deren Kombination inkubiert und mittels MTT-Test auf ihre Viabilität untersucht. Die maximalen Konzentrationen betrugen je nach Zelllinie für *TRAIL* 20-80 ng/mL, für *atRA* und *9cisRA* je 100-1000 nmol/L. Sämtliche *IC*₅₀- und *CI*-Werte wurden aus dem jeweiligen MTT-Datensatz mittels *CalcuSyn* berechnet.

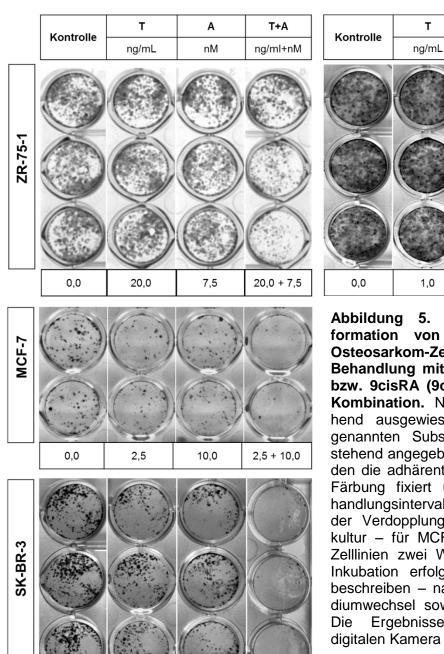
Die IC₅₀ der kombinierten Anwendung von TRAIL und atRA lag für epitheliale MCF7-Mammakarzinom-Zellen, die sich bereits gegenüber beiden Mono-Regimen als resistent erwiesen, jeweils oberhalb der maximal applizierten Konzentrationen. Die hierbei maximal erreichte Zellviabilitäts-Reduktion betrug 37%. Der zugehörige CI von rund 0,18 sowie der jeweils per Simulation ermittelte Cl_{IC50} von 0.11 und Cl_{IC90} von 0,02 implizieren zwar einen Dosis-abhängig zunehmenden Synergismus, dieser ist jedoch lediglich bei Applikation verhältnismäßig hoher Konzentrationen für die Reduktion der Tumorzell-Viabilität relevant. Auch für die ebenfalls epithelialen Mammakarzinom-Zelllinien T-47D, ZR-75-1 und SK-BR-3, die hingegen moderate Responsivitäten gegenüber TRAIL zeigten, wurden für die Kombination von TRAIL und atRA jeweils Cl_{IC50}-Werte um 0,1 ermittelt. Überdies ergaben sämtliche Kombinations-Indizes innerhalb eines sich mindestens von der IC_{35} bis zur IC_{90} erstreckenden Konzentrations-Intervalls Werte kleiner als Eins. Jener hier offensichtliche Synergismus von TRAIL und atRA zeigte sich des Weiteren an ZR-75-1-Zellen durch Reduktion der IC₅₀ für TRAIL auf 15% bzw. für atRA auf 0,1% der Einzeldosis, in SK-BR-3-Zellen durch Reduktion der IC50 für TRAIL auf 7% bzw. für atRA auf 4% der Einzeldosis sowie in T-47D-Zellen durch Reduktion der IC₅₀ für TRAIL auf 6% bzw. für atRA auf 4% der Einzeldosis. Die aus kombinierter Applikation von TRAIL und atRA resultierende

maximale Viabilitäts-Reduktion betrug für ZR-75-1 92%, für SK-BR-3 77% (siehe auch Abbildung 3 A) sowie für T-47D 51%. Für die kombinierte Anwendung von TRAIL und 9cisRA in SK-BR-3-Zellen ergab sich des Weiteren eine IC50-Reduktion auf 21% des Wertes für TRAIL allein und 37% des Wertes für 9cisRA allein. Sämtliche Kombinations-Indizes implizieren für Konzentrationen oberhalb der IC25 einen Dosisabhängig zunehmenden Synergismus bei einer maximalen Viabilitäts-Reduktion von 85% (siehe auch Abbildung 3 B). An der epithelialen Mammakarzinom-Zelllinie BT-474, die eine allenfalls geringfügige TRAIL- und atRA-Responsivität aufwies, war hingegen kein Kombinationseffekt jener Pharmaka nachweisbar: die maximale Zellviabilitäts-Reduktion von 41% war vielmehr das Resultat des zytotoxischen Effekts von TRAIL A). (siehe Abbildung Auch an Retinoid-resistenten mesenchymalen Mammakarzinom-Zellen vom Typ MDA-MB-231 ließ sich durch Addition von atRA keine signifikante Augmentation der TRAIL-vermittelten Vitalitäts-Inhibition induzieren (Daten nicht gezeigt).

die epitheliale Osteosarkom-Zelllinie Saos-2, die moderate Responsivität gegenüber TRAIL- und Retinoid-induzierter Proliferationsinhibition zeigte, resultierte die Kombination von TRAIL und 9cisRA in einer IC₅₀-Reduktion auf 14% der Einzeldosis für TRAIL und 6% der Einzeldosis für 9cisRA. Synergistische Effekte bestanden insbesondere für Bereiche geringer und moderater Dosis, ließen sich jedoch insgesamt für Konzentrationen bis zur IC₇₅ nachweisen. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit TRAIL und 9cisRA resultierte in einer maximalen Viabilitäts-Inhibition um 55% (siehe auch Abbildung 3 D). Eine Kombination gleicher Konzentrationen von TRAIL und atRA war des Weiteren mit einer maximalen Hemmung um 50% assoziiert (siehe auch Abbildung 3 C). Ein Synergismus bestand für Dosen oberhalb der IC₃₅. Die TRAILsensitive, Retinoid-resistente mesenchymale Osteosarkom-Zelllinie MG-63 zeigte hingegen bei kombinierter Behandlung mit TRAIL und atRA bzw. 9cisRA keine relevante Reduktion der IC₅₀ für TRAIL. Da die Kombinations-Indizes für die Applikation von TRAIL und atRA über den gesamten erfassten Dosis-Wirkungs-Bereich von der IC2 bis zur IC_{99} zwischen 1,2 und 2,2 lagen, kann ein Synergismus nicht angenommen werden. Für die Inkubation mit TRAIL und 9cisRA nahmen die Kombinations-Indizes von der IC_2 mit einem Wert von 15 bis zur IC_{99} mit einem Wert von 0,5 kontinuierlich ab. Die aus einer Kombination von TRAIL und Retinoiden resultierende Viabilitäts-Reduktion in Zellpopulationen der Linie MG-63 betrug jeweils maximal rund 76%; dem entsprach ein Wert von rund 69% für *TRAIL* als Mono-Regime. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass jene in MG-63-Zellen beobachtete Viabilitätsreduktion hauptsächlich auf die Zytotoxizität von *TRAIL* zurückzuführen ist (siehe auch Abbildung 4 B und C).

4.3 Der TRAIL- und Retinoid-vermittelten Inhibition der Tumorzellproliferation können sowohl zytostatische als auch zytotoxische Mechanismen zugrunde liegen

Der Charakterisierung des Einflusses einer Kombination von *TRAIL* und Retinoiden auf die Viabilität von Tumorzell-Verbänden schloss sich die Frage an, ob sich jene beobachteten Tendenzen entsprechend am Proliferationsverhalten von Einzelzellen nachweisen ließen. Zu diesem Zweck wurden *Clonogenic Assays* in Suspensionskultur durchgeführt (siehe Abbildung 5). Die im Vergleich zum MTT-Test geringere Dichte ausgesäter Zellen sowie die längere Inkubationsdauer von ein bis zwei Wochen erforderten hierbei die Applikation relativ geringer Konzentrationen der jeweiligen Substanz, die für *TRAIL* 1 bis 20 ng/mL, für *atRA* 7,5 bis 25 nmol/L sowie für *9cisRA* 40 nmol/L betrugen.



25,0

1,0 + 40,0 Abbildung 5. Fähigkeit der Kolonieformation von Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit TRAIL (T) und atRA (A) bzw. 9cisRA (9c) allein sowie mit deren Kombination. Nach Inkubation nebenstehend ausgewiesener Zelllinien mit oben genannten Substanzen in jeweils untenstehend angegebenen Konzentrationen wurden die adhärenten Kolonien mittels Quick-Färbung fixiert und visualisiert. Das Behandlungsintervall betrug - abhängig von der Verdopplungsrate der jeweiligen Zellkultur - für MCF-7 eine, für alle anderen Zelllinien zwei Wochen. Bei zweiwöchiger Inkubation erfolgten - wie in Punkt 2.4 beschreiben - nach sieben Tagen ein Mediumwechsel sowie eine Nachbehandlung. Die Ergebnisse wurden mittels digitalen Kamera fotografisch festgehalten.

T+9c

ng/ml+nM

nΜ

40,0

Entgegen der mittels MTT-Test nachgewiesenen Resistenz der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 gegenüber TRAIL- bzw. atRA-vermittelter Viabilitäts-Inhibition zeigte sich im Clonogenic Assay auch bei alleiniger Applikation jener Substanzen eine Responsivität, die sich insbesondere durch eine Reduktion der Kolonie-Zahl sowie der Koloniegröße und -dichte darstellte. Beide Substanzen fungieren demnach sowohl als zytostatische als auch als zytotoxische Proliferationsinhibitoren. Überdies resultierte die kombinierte Behandlung der MCF-7-Zellen mit TRAIL und atRA in einem nahezu

5,0 + 25,0

vollständigen Wachstums-Arrest: nur vereinzelt konnten kleinste Kolonien geringer Zelldichte identifiziert werden. Entsprechende Effekte waren des Weiteren für die Zelllinie SK-BR-3 nachweisbar. Ein Großteil der Kolonien der Zelllinie ZR-75-1 war zwar gegen Ende der Inkubationszeit bereits konfluent, sodass deren absolute Quantifizierung nicht mehr möglich war; dennoch zeigte sich bei geringem Effekt der Mono-Regime eine deutlich stärkere Kombinations-bedingte Proliferationsinhibition anhand des vergleichbar geringeren Konfluenzgrades sowie anhand der höheren Transluzenz der entsprechenden *Well*-Böden. Geringere mittlere Durchmesser und Dichten der sich in der Kombinations-Probe abzeichnenden Einzelkolonien lassen auch in diesem Fall zytotoxische und zytostatische Mechanismen vermuten. Auch jene Kolonien der Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 waren gegen Ende des Inkubations-Intervalls konfluent. Das Proliferationsverhalten während kombinierter Behandlung mit *TRAIL* und *9cisRA* wurde im Vergleich zu vorgenannten Mammakarzinom-Zelllinien am geringsten beeinträchtigt.

4.4 Die *TRAIL*- und Retinoid-vermittelte Proliferationsinhibition korreliert mit dem Grad der *DNA*-Fragmentierung in SK-BR-3-Zellen

Unter dem Aspekt der mittels MTT und *Clonogenic Assay* nachgewiesenen *TRAIL*- und Retinoid-vermittelten Tumorzell-Toxizität war nunmehr deren Korrelation mit einer eventuellen Apoptose-Induktion von Interesse. Als messbares molekularbiologisches Korrelat jenes programmierten Zellsterbens diente der Grad der *DNA*-Fragmentierung, der mittels *TUNEL-Assay* direkt in den Nuclei (in situ) (siehe Abbildung 6) und mittels *Cell Death Detection ELISA* (siehe Abbildung 7) in kernfreien Zytoplasma-Überständen der Zellkulturproben bestimmt wurde. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der anhand verschiedener Methoden ermittelten Ergebnisse wurde die für den MTT-Test gewählte Relation der Konzentrationen von *TRAIL* und *atRA* für das dem jeweiligen *DNA*-Fragmentierungs-*Assay* vorausgehende Behandlungs-Intervall beibehalten.

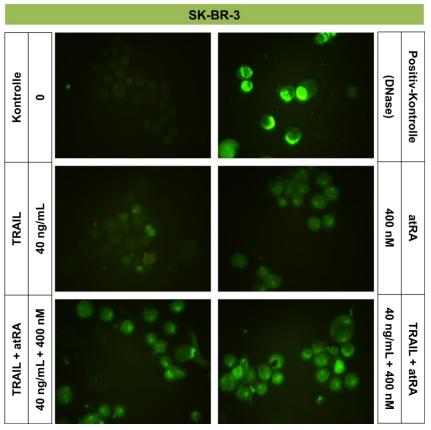


Abbildung 6. Grad nukleärer DNA-Fragmentierung in SK-BR-3-Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit TRAIL und atRA allein sowie mit deren Kombination. O.g. Zellen wurden über 24 h mit nebenstehend genannten Substanzen in ausgewiesenen Konzentrationen behandelt. Anschließend erfolgte mittels TUNEL-Verfahren die Proben-Analyse. Als Kontrollen dienten eine unbehandelte sowie eine vor Durchführung des TUNEL-Assay DNAse behandelte Probe. Die Intensität der Fluoreszenz (grün) gibt den Grad der nukleären DNA-Fragmentierung wieder.

Wie oben stehende Abbildung 6 zeigt, führte – verglichen mit der unbehandelten Kontrolle – die alleinige Applikation sowohl von *TRAIL* als auch von *atRA* in SK-BR-3-Zellen zu einer gesteigerten Kern-Fluoreszenz, deren Ausmaß für *atRA* in o.g. Konzentration größer war als für die entsprechende *TRAIL*-Dosis. Überdies resultierte die kombinierte Anwendung jener Pharmaka in einer weiteren Intensitäts-Zunahme relativ zum jeweiligen Mono-Regime. Der Grad der *DNA*-Fragmentierung in SK-BR-3-Zellkernen lässt sich demnach durch kombinierte Behandlung mit *TRAIL* und *atRA* steigern.

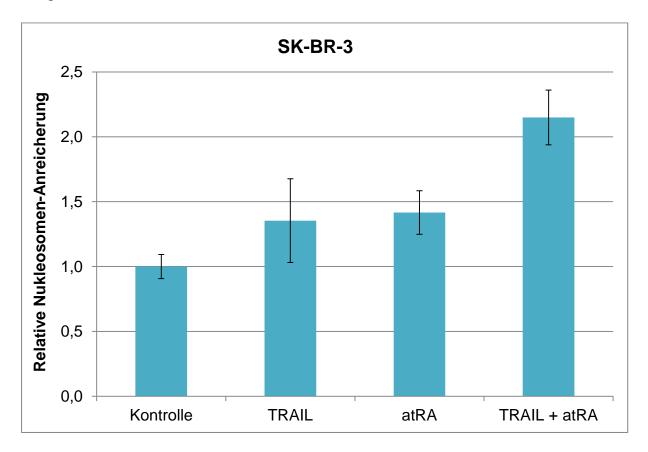


Abbildung 7. Relative Anreicherung von Nukleosomen im Zytoplasma von SK-BR-3-Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit TRAIL, atRA oder TRAIL+atRA und in Relation zur unbehandelten Kontrolle. SK-BR-3-Zellen wurden über vier Tage mit TRAIL (5 ng/mL) sowie mit atRA (50 nmol/L) allein und mit deren Kombination inkubiert. Die Quantifizierung der Nukleosomen-Anreicherung erfolgte anhand des Cell Death Detection ELISA PLUS-Kits. Die Anreicherungsfaktoren wurden mittels Division der so ermittelten Proben-Werte durch den Kontroll-Wert ermittelt und zur Zellzahl normalisiert. Jene Berechnung definierte die im obenstehenden Schaubild angegebene relative Nukleosomen-Anreicherung.

Sowohl TRAIL als auch atRA bedingten bereits als Mono-Regimen in kernfreien Zytoplasma-Überständen von SK-BR-3-Zellen eine im Vergleich zur Kontrolle geringfügige Steigerung der Nukleosomen-Anreicherung. Deren bei kombinierter Applikation beobachtete Erhöhung auf mehr als das Doppelte des Kontroll-Wertes

impliziert jene angenommene Kooperation von *TRAIL* und *atRA* hinsichtlich ihrer proapoptptischen Aktivität (siehe Abbildung 7).

Für die genannte Zelllinie korrelierten demnach die anhand des *TUNEL-Assay* und des *Cell Death Detection ELISA*^{PLUS} eruierten Tendenzen der *DNA*-Fragmentierung mit den im MTT-Test ermittelten Einflüssen von *TRAIL* und *atRA* auf die Zellviabilität. Auch unter der Prämisse der mittels *Clonogenic Assay* gezeigten Tumorzelltoxizität jener Substanzen lag die Apoptose-Induktion als einer der ursächlichen Mechanismen der bisher nachgewiesenen Phänomene nahe.

4.5 Die Inkubation von SK-BR-3- und Saos-2-Zellen mit Retinoiden korreliert mit der Spaltung der *Procaspasen* 3 und 9

Sämtliche Modi der Apoptose-Induktion konvergieren auf der Ebene der Spaltung von *Procaspasen* in aktive proteolytische Einheiten. Jene hierbei entstehenden, entweder als Initiator- oder als Effektor-*Caspasen* fungierenden Spaltprodukte lassen sich unter anderem in Gesamt-Zell-Proteinlysaten mittels *Western-Blot*-Verfahren detektieren. Ihre Existenz in einer Analysenprobe gilt demnach als Indikator stattgehabter Apoptose-Prozesse. Zur weiteren Exploration der Hypothese einer Steigerung der Apoptose-Induktion bei kombinierter Anwendung von *TRAIL* und Retinoiden wurden entsprechend Spaltprodukte der *Procaspasen* 3 und 9 in den wie in Abbildung 8 ausgewiesen inkubierten Zellpopulationsproben detektiert sowie deren relative Quantitäten unter dem Aspekt der jeweiligen Behandlung ausgewertet.

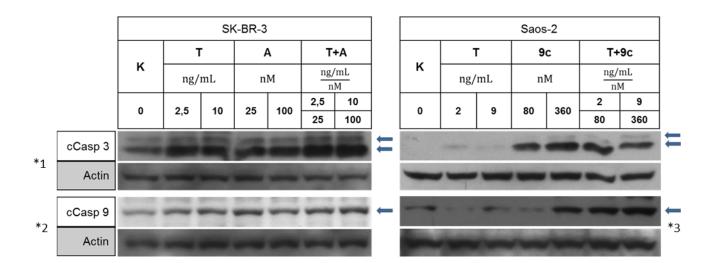


Abbildung 8. Spaltung der *Procaspasen* 3 und 9 in SK-BR-3- und Saos-2-Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit *TRAIL* (T) und *atRA* (A) bzw. *9cisRA* (9c) allein sowie mit deren Kombination. SK-BR-3-Zellen wurden über fünf, Saos-2-Zellen über vier Tage mit o.g. Substanzen in ausgewiesenen Konzentrationen behandelt. Die Spaltprodukte der *Procaspasen* 3 (cCasp 3) und 9 (cCasp 9) in Gesamt-Zell-Proteinlysaten wurden mittels *Western-Blot*-Verfahren detektiert und die Proben-abhängigen Schwankungen ihrer Quantitäten durch Vergleich mit entsprechenden Ladekontrollen (Actin) überprüft. Die jene Spaltprodukte repräsentierenden Proteinbanden sind durch Pfeile gekennzeichnet.

*1, *2, *3: Die mit * und der jeweiligen Ziffer gekennzeichneten Western-Blot-Ergebnisse (siehe Abbildungen 8, 11 und 12) sind für jeweils identische Ziffern an jeweils derselben PVDF-Membran erhoben worden.

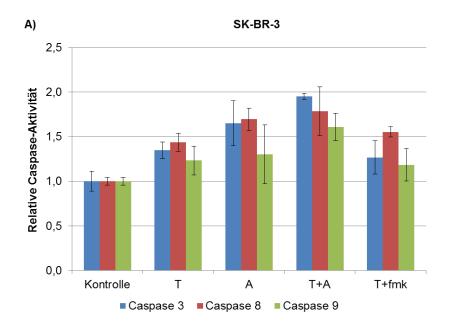
Für Zellpopulationsproben vom Typ SK-BR-3, die entweder mit TRAIL oder mit atRA behandelt worden waren, zeigt die oben stehende Abbildung 8 im Vergleich zur Kontrollprobe deutlich höhere Quantitäten Procaspase-3-Spaltprodukten. an Entsprechende Proteinbanden treten in Proben, die einer kombinierten Applikation unterzogen worden waren, in nochmals höherer Intensität hervor. Die Auswertung wiederholter Western-Blot-Experimente (Daten nicht gezeigt) ließ hingegen lediglich die Schlussfolgerung einer atRA-vermittelten Steigerung der Quantitäten iener Spaltprodukte zu. Eine mit der Applikation von TRAIL korrelierende Steigerung der Caspase-3-Aktivierung war hier weder für das Mono-Regime, noch für die Kombination nachweisbar. Demgegenüber zeigten die Quantitäten der Procaspase-9-Spaltprodukte im Vergleich der Analysenproben untereinander und in Relation zur entsprechenden Protein-Ladekontrolle keine relevanten Alterationen. In Zusammenschau mit weiteren Western-Blot-Ergebnissen (Daten nicht gezeigt) konnte jedoch eine Induktion der Spaltung von Procaspase 9 durch atRA bzw. durch TRAIL allein - wenngleich auch hier kein diesbezüglicher Kombinationseffekt nachweisbar war - nicht ausgeschlossen werden. Da SK-BR-3-Tumorzellen per se auch unter Standard-Kulturbedingungen einer gewissen basalen Apoptose-Rate unterliegen, waren entsprechend in der unbehandelten Kontrollprobe ebenfalls *Procaspase*-Spaltprodukte detektierbar.

Für die Saos-2-Zelllinie ließ sich – wie in Abbildung 8 weiterhin verdeutlicht – sowohl in mit 9cisRA allein als auch in kombiniert mit TRAIL behandelten Analysenproben eine deutlich gesteigerte Prozessierung Procaspase 3 der nachweisen. Kombinationseffekt in Form der weiteren Intensitätszunahme entsprechender Protein-Banden bestand überdies für niedrige Konzentrationen von TRAIL und 9cisRA. Auch erwies sich dieser in einem wiederholten Western-Blot-Experiment (Daten nicht gezeigt) als reproduzierbar. Ob auch TRAIL allein eine nennenswerte Spaltung der Procaspase 3 induziert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Weiterhin vermochte die Mono-Applikation von 9cisRA, nicht jedoch von TRAIL, eine Steigerung der Caspase-9-Aktivierung zu evozieren. Für die Kombination sowohl in geringer als auch in hoher Konzentration zeigt die genannte Abbildung zwar eine weitere Zunahme der Intensitäten entsprechender Banden, jener Kombinationseffekt ließ sich jedoch in weiteren Western-Blot-Ergebnissen nicht bestätigen.

Auf der Grundlage vorangehend dargelegter *Western-Blot*-Ergebnisse wird abschließend festgehalten, dass die Behandlung von SK-BR-3-Zellen mit *atRA* sowie von Saos-2-Zellen mit *9cisRA* mit der Detektion erhöhter Quantitäten an Spaltprodukten der *Procaspase*-3 und -9 korreliert. Eine überdies hinausgehende Steigerung der *Caspase*-Prozessierung infolge der Kombination mit *TRAIL* konnte für die *Procaspase* 3 an der Zelllinie Saos-2 reproduzierbar demonstriert werden.

4.6 TRAIL- und Retinoid-vermittelte Aktivitäten der Caspasen 3, 8 und 9 sind jeweils Zelltyp-spezifisch

Ob die relativen Quantitäten der mittels des Western-Blot-Verfahrens detektierten Procaspase-Spaltprodukte tatsächlich mit den Aktivitäten der jeweiligen Proteasen korrelieren, wurde anhand entsprechender Caspase-Activity-Assays untersucht. Besonderes Interesse galt hierbei neben den oben erwähnten Caspasen 3 und 9 auch der Caspase 8.



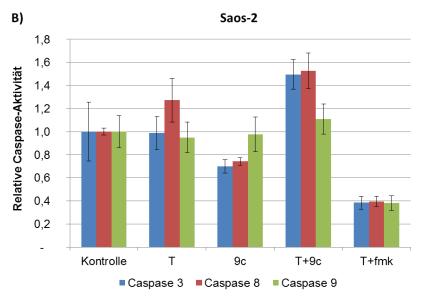


Abbildung 9. Aktivitäten der Caspasen 3, 8 und 9 in A) SK-BR-3 und B) Saos-2-Zellen Abhängigkeit der Behandlung mit TRAIL (T), atRA (A) bzw. 9cisRA (9c) allein sowie mit deren Kombination und in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Nach viertägiger Inkubation mit TRAIL (SK-BR-3: 10 ng/mL; Saos-2: 12,5 ng/mL) und 9cisRA (Saos-2: 500 nmol/L) bzw. atRA (SK-BR-3: 100 nmol/L) allein sowie in Kombination wurden die o.g. Caspase-Aktivitäten mittels entsprechenden Caspase-Activity-Assay-Kits bestimmt. Je eine der doppelt angelegten TRAIL-Proben wurde vor Auswertung mit 10 µmol/L des pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK (fmk) versetzt.

Bereits die Behandlung von SK-BR-3-Zellen mit *TRAIL* bzw. atRA allein korrelierte mit einer relativ zur Kontrolle geringfügigen Steigerung der Aktivitäten der *Caspasen* 8, 9 und 3 (siehe Abbildung 9 A). Lediglich für die Vertreter 3 und 9 konnte ein allenfalls marginaler Kombinations-Effekt in Form einer weiteren Steigerung ihrer Aktivitäten nachgewiesen werden. Die geschilderten Tendenzen der Behandlungs-abhängigen *Caspase*-Aktivitäten in SK-BR-3-Zellen ähnelten den eingangs demonstrierten Alterationen der nukleären *DNA*-Fragmentierung. Das Phänomen der atRA-induzierten Steigerung der *Caspase*-Aktivität korrelierte überdies mit der Detektion von *Procaspase*-Spaltprodukten in entsprechenden Protein-Lysaten. In Zusammenschau mit den *Western-Blot*-Ergebnissen bleibt jedoch zu klären, ob die Einzelbehandlung mit

TRAIL tatsächlich eine Prozessierung und Aktivierung der Procaspasen 3 und 9 bedingt und ob ein diesbezüglicher Kombinationseffekt mit atRA tatsächlich besteht. Des Weiteren fiel auf, dass die Addition eines Caspase-Inhibitors keine Reduktion der TRAIL-induzierten Caspase-Aktivierung nach sich zog.

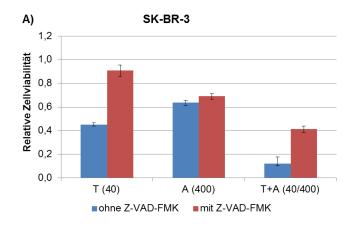
Die Inkubation der Zelllinie Saos-2 mit TRAIL allein resultierte in einer relativ zur Kontrolle geringfügigen Steigerung der Caspase-8-Aktivität (siehe Abbildung 9 B). Eine TRAIL-vermittelte Aktivierung war hingegen für die Caspase 9 weder in diesem noch im Western-Blot-Experiment nachweisbar und blieb auch für die Caspase 3 ungeklärt. Demgegenüber vermochte die Behandlung mit 9cisRA die Aktivitäten der Caspasen 3 und 8 auf Intensitäten unterhalb des Kontrollniveaus zu reduzieren. Dies widerspricht nicht nur den vorgenannten Erkenntnissen zur Retinoid-vermittelten Spaltung von Procaspasen, sondern impliziert entweder eine unter Standard-Kulturbedingungen in Saos-2-Zellen vorherrschende basale Caspase-Aktivität oder ist Ausdruck eines womöglichen methodisch bedingten Artefakts. Gleichwohl war der die Caspase-3-Aktivität betreffende Kombinationseffekt von TRAIL und 9cisRA vereinbar mit entsprechenden im Western Blot nachgewiesenen Tendenzen. Für die Aktivitäten der Caspasen 8 und 9 waren jene Kombinationseffekte allenfalls marginal. Des Weiteren resultierte die Addition des Caspase-Inhibitors in einer deutlichen Reduktion sämtlicher TRAIL-assoziierter Caspase-Aktivitäten.

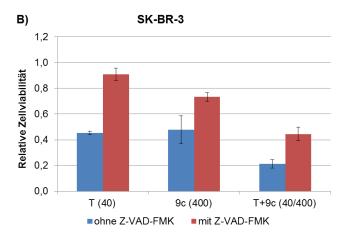
Da Western Blot und Caspase-Activity-Assay jeweils distinkte Sensitivitäten sowie Limitationen aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass sich die jeweils für die einzelnen Caspasen ermittelten Resultate nicht exakt kongruent darstellen. Entscheidend ist jedoch vielmehr die aus den Ergebnissen beider Methoden ableitbare Tendenz einer atRA-vermittelten Aktivierung der untersuchten Initiator- und Effektor-Caspasen in SK-BR-3-Zellen und eines Kombinationseffekts von TRAIL und 9cisRA hinsichtlich der Aktivierung der Caspase 3 in Saos-2-Zellen.

4.7 Pan-Caspase-Inhibition korreliert mit einer Erhöhung der Viabilität TRAIL- sowie kombiniert TRAIL- und Retinoid-behandelter Tumorzellen

Zur weiteren Evaluierung der Relevanz der Caspase-Kaskade für den mittels MTT-Test nachgewiesenen Kombinationseffekt von TRAIL und Retinoiden auf die Reduktion der

Zellviabilität, sollten nunmehr deren Behandlungs-abhängige Alterationen in An- und Abwesenheit des pan-*Caspase*-Inhibitors Z-VAD-FMK miteinander verglichen werden.





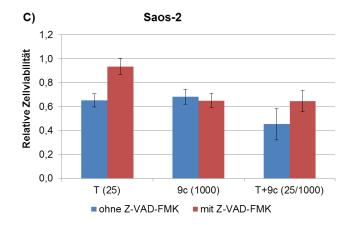


Abbildung 10. Einfluss der Caspase-Inhibition auf die Viabilitäten der mit TRAIL (T) und atRA (A) bzw. 9cisRA (9c) allein sowie mit Kombination behandelten Zelllinien SK-BR-3 und Saos-2. Nach fünftägiger Inkubation mit den jeweils in Klammern angegebenen Dosen von TRAIL (ng/mL), atRA bzw. 9cisRA (nmol/L) allein sowie mit deren Kombination - jeweils in An- und Abwesenheit des pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK (20 µmol/L) - wurden mittels MTT-Test die Viabilitäten der Zellpopulationsproben bestimmt.

Wie die Angaben in Abbildung 10 A und B verdeutlichen, führte die Applikation von Z-**VAD-FMK** TRAIL-behandelten SK-BR-3-Zellpopulationen in einer zu 45% 91% unbehandelten Kontrollprobe. Viabilitätssteigerung von auf der Demgegenüber blieb die Zellviabilität bei Inkubation mit atRA auch unter dem Einfluss der Caspase-Inhibition mit einer Veränderung von 64% auf 69% relativ stabil, während

sich jener Wert für 9cisRA von 48% auf 73% erhöhte. Die aus kombinierter Anwendung von TRAIL und atRA bzw. TRAIL und 9cisRA resultierenden Viabilitäten zeigten in Anwesenheit von Z-VAD-FMK eine Steigerung von 12% auf 41% bzw. von 21% auf 45%. Die anhand der CalcuSyn-Software für verschiedene Dosis-Wirkungs-Bereiche ermittelten CI-Werte blieben jedoch trotz Caspase-Hemmung für die Kombination von TRAIL und atRA von der IC₂ bis zur IC₅₅ sowie für die Kombination von TRAIL und 9cisRA von der IC₂ bis zur IC₇₀ kleiner als Eins: demnach vermochte der Caspase-Inhibitor zwar Viabilitäts-reduzierende Effekte von TRAIL und dessen Kombination mit Retinoiden zu vermindern, der eingangs demonstrierte Synergismus jener Substanzen blieb jedoch – auf entsprechend erhöhtem Viabilitäts-Niveau – bestehen. Jener Nachweis impliziert, dass in SK-BR-3-Zellen insbesondere die TRAIL-induzierte Viabilitäts-Reduktion auf die Aktivität von Caspasen zurückzuführen ist, wenngleich dies - zumindest für die Caspasen 3 und 9 - mittels Western Blot nicht eindeutig, wohl aber anhand entsprechender Caspase-Activity-Assays, bestätigt werden konnte. Des Weiteren war in diesem Experiment keine Kausalität zwischen der Behandlung von SK-BR-3-Zellen mit atRA und den laut vorgenannten Erkenntnissen hiermit korrelierenden Aktivitäten der Caspasen 8, 9 und 3 nachzuweisen, da die erwartete Aufhebung der atRA-vermittelten Viabilitäts-Reduktion durch Applikation des pan-Caspase-Inhibitors ausblieb. Die gleichwohl in Anwesenheit von Z-VAD-FMK beobachtete Hemmung der Kombinations-bedingten Viabilitäts-Reduktion bestätigte zwar die Relevanz der Caspasen für gemeinsame TRAIL- und atRA-vermittelte zytotoxische Effekte. Hiermit vereinbar sind auch die Beobachtungen einer jeweils relativ zur Kontrolle erhöhten Caspase-Spaltung sowie Caspase-Aktivität in kombiniert mit TRAIL und atRA inkubierten SK-BR-3-Kulturen. Der trotz Caspase-Inhibition weiterhin bestehende Synergismus gab dennoch Anlass zur Hypothese, dass sich insbesondere der Kombinationseffekt von TRAIL und atRA in SK-BR-3-Zellen auf andere Mechanismen gründet.

Die Inkubation *TRAIL*-behandelter Saos-2-Zellkulturproben mit Z-VAD-FMK war mit einer Viabilitätssteigerung von 65% auf 94% der unbehandelten Kontrollprobe assoziiert (siehe Abbildung 10 C). Unter Einbeziehung der Ergebnisse des *Caspase-Activity-Assay* kann in diesem Zusammenhang eine Beteiligung der *Caspase* 8 vermutet werden. Des Weiteren korrelierte die *Caspase*-Inhibition mit keiner Erhöhung der Viabilität *9cisRA*-behandelter Saos-2-Zellen. Die Aktivität von *Caspasen* ist demnach

als Ursache der 9cisRA-vermittelten Zytotoxizität in Saos-2-Zellen unwahrscheinlich. Jene Schlussfolgerung ist zwar vereinbar mit der im Caspase-Activity-Assay beobachteten ausbleibenden Aktivitätssteigerung der Caspasen 8, 9 und 3 in 9cisRAbehandelten Saos-2-Zellen, widerspricht jedoch der anhand des Western Blot für diese Zelllinie nachgewiesenen Erhöhung der Quantitäten von Caspase-9- und -3-Spaltprodukten. Dennoch war die Anwendung von Z-VAD-FMK für die Kombination von TRAIL mit 9cisRA in o.g. Dosen nicht nur mit einer Erhöhung der Zellviabilität von 45% auf 65% assoziiert; auch nahmen die Kombinations-Indizes für Dosis-Wirkungs-Bereiche von der IC₂₅ bis zur IC₉₉ Werte über Eins an, die einen Synergismus nahezu ausschließen. Für Saos-2-Zellen ist demnach die Aktivität von Caspasen sowohl an der TRAIL-induzierten als auch an der gemeinsamen TRAIL- und 9cisRA-vermittelten Viabilitäts-Reduktion und überdies an dem in diesem Zusammenhang nachgewiesenen Kombinationseffekt beteiligt. In Zusammenschau mit den vorangehend demonstrierten Ergebnissen des Western Blot und des Caspase-Activity-Assay kann – insbesondere für den Kombinations-Effekt auf die Viabilität von Saos-2-Zellen sowie für den diesbezüglichen Synergismus von TRAIL und 9cisRA – eine Beteiligung der Caspase 3 vermutet werden.

Da weitere als die genannten *Caspasen* 8, 9 und 3 nicht Gegenstand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente waren, kann auch deren Mitwirken an den hier untersuchten Phänomenen nicht ausgeschlossen werden.

4.8 Regulierung der Death Receptors 4 und 5 durch TRAIL und Retinoide

Im Fokus folgender Analysen stand die Exploration *TRAIL*- und Retinoid-vermittelter Alterationen der *Death-Receptor*-Expression sowie die diesbezügliche Re-Evaluierung bisher nachgewiesener Kombinations-Effekte.

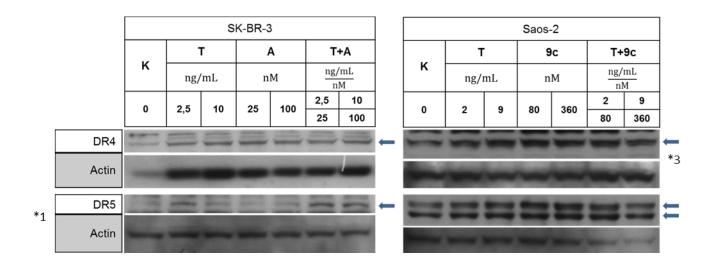


Abbildung 11. Expression von *DR*4 und *DR*5 in SK-BR-3- und Saos-2-Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit *TRAIL* (T) und *atRA* (A) bzw. *9cisRA* (9c) allein sowie mit deren Kombination. SK-BR-3-Zellen wurden über fünf, Saos-2-Zellen über vier Tage mit o.g. Substanzen in ausgewiesenen Konzentrationen behandelt. *DR*4 und *DR*5 wurden in Gesamt-Zell-Proteinlysaten mittels *Western-Blot*-Verfahren detektiert und die Proben-abhängigen Schwankungen ihrer Quantitäten durch Vergleich mit entsprechenden Ladekontrollen (Actin) überprüft. Die repräsentierenden Proteinbanden sind durch Pfeile gekennzeichnet.

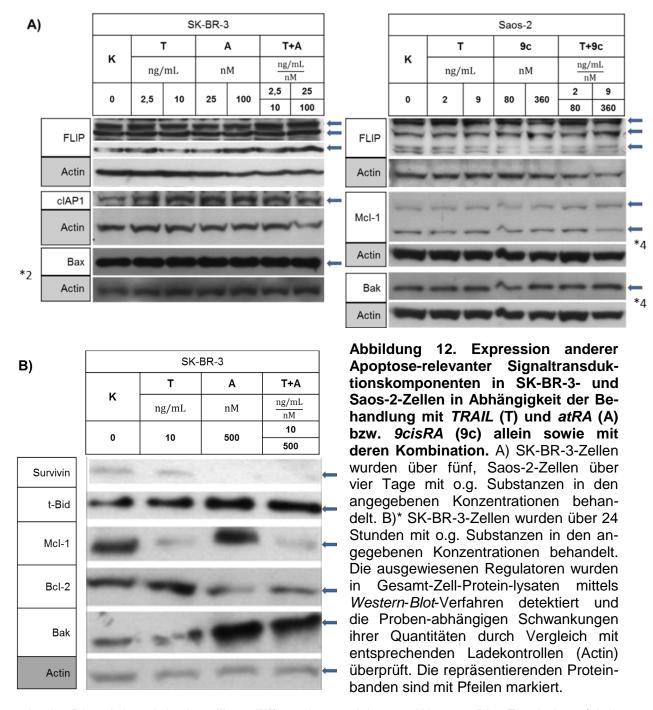
*1, *3: Die mit * und der jeweiligen Ziffer gekennzeichneten Western-Blot-Ergebnisse (siehe Abbildungen 8, 11 und 12) sind für jeweils identische Ziffern an jeweils derselben PVDF-Membran erhoben worden.

Der obenstehenden Abbildung 11 kann insbesondere eine Korrelation zwischen der kombinierten Behandlung von SK-BR-3-Zellen mit *TRAIL* und *atRA* und einer *DR*5-Hochregulation entnommen werden. Jenes Phänomen war in deutlich geringerem Maße ebenfalls für die alleinige Applikation von *TRAIL* offensichtlich, während sich die eingangs vermutete *atRA*-bedingte *DR*5-Expressionssteigerung nicht bestätigte. Für *DR*4 waren in entsprechenden Gesamt-Zell-Proteinlysaten hingegen weder *TRAIL*-oder *atRA*-vermittelte, noch Kombinations-bedingte Alterationen nachweisbar. In SK-BR-3-Zellen kooperieren demnach *TRAIL* und *atRA* insbesondere durch Hochregulation des *DR*5. Überdies entsprachen die Tendenzen der *TRAIL*- sowie der Kombinations-assoziierten *DR*5-Alteration denen der bereits anhand des MTT-Tests erwiesenen Zellviabilitäts-Reduktion und gaben folglich Anlass zur Hypothese einer Beteiligung dieses Rezeptors an der von *TRAIL* und *atRA* gemeinsam vermittelten Zytotoxizität. Darüber hinaus lässt der in diesem Experiment nachgewiesene Kombinationseffekt hinsichtlich der *DR*5-Expression eine Relevanz jener Komponente für den zytotoxischen Synergismus von *TRAIL* und *atRA* in SK-BR-3-Zellen vermuten.

Wie obige Abbildung 11 weiterhin zeigt, war in Gesamt-Zell-Proteinlysaten von Saos-2-Kulturen keine nennenswerte Modulation der Expression des *DR*5 in Abhängigkeit der jeweils angegebenen Behandlung und im Vergleich zur entsprechenden Protein-Ladekontrolle nachweisbar. Die Expression von *DR*4 hingegen erwies sich sowohl in mit *TRAIL* als auch in mit *9cisRA* allein behandelten Saos-2-Kulturen als geringfügig erhöht, wenngleich die kombinierte Applikation mit keiner weiteren Hochregulation assoziiert war. Die Korrelation der *TRAIL*- bzw. der *9cisRA*-vermittelten Reduktion der Viabilität von Saos-2-Zellen mit der anhand des *Western Blot* für jene Substanzen nachgewiesenen moderaten Steigerung der *DR*4-Expression gab zwar Anlass zur Hypothese einer Relevanz jenes Rezeptors für die Zytotoxizität der Mono-Regime, seine Beteiligung an deren Synergismus blieb jedoch ungeklärt.

4.9 Regulierung anderer relevanter Komponenten der *TRAIL*-Signaltransduktion und Apoptose-Induktion

Schließlich waren Alterationen der Expression weiterer potenzieller Modulatoren der *TRAIL*-Signaltransduktion und Apoptose-Induktion unter dem Aspekt der bisher erschlossenen *TRAIL*- und Retinoid-vermittelten Effekte sowie hinsichtlich der Responsivität von Tumorzellen auf entsprechende Mono- und Kombinationsregime von Interesse. Im Fokus jener Protein-Expressions-Analysen standen hierbei das *Caspase*-Struktur-Homolog *FLIP*, das die *Caspase*-8- und -10-Rekrutierung im Rahmen der Assemblierung des *DISC* hemmt, die Apoptose-Inhibitoren der IAP-Familie *cIAP1* und *Survivin*, die aktive Effektor-*Caspasen* 3 und 7 sowie die Initiator-*Procaspase* 9 binden und inaktivieren, sowie die insbesondere für die Apoptose-Regulation in Typ-II-Zellen essenziellen *BcI-2*-Proteine, darunter die proapoptotischen Vertreter *Bax* und *Bak*, die eine Desintegration der äußeren Mitochondrienmembran bedingen, und der antiapoptotische Vertreter *McI-1*.



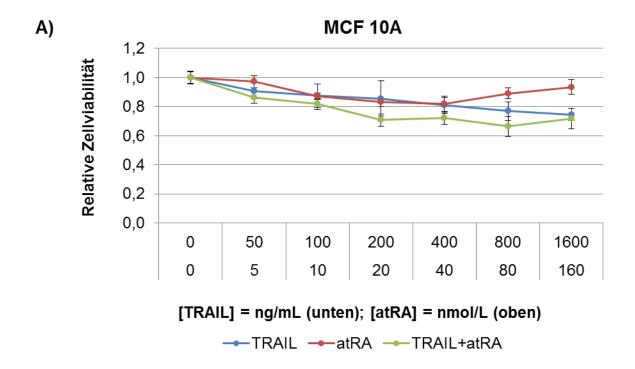
*2, *4: Die mit * und der jeweiligen Ziffer gekennzeichneten Western-Blot-Ergebnisse (siehe Abbildungen 8, 11 und 12) sind für jeweils identische Ziffern an jeweils derselben PVDF-Membran erhoben worden.

Während weder das *Caspase*-Homolog *FLIP*, noch der Vertreter der IAP-Familie *cIAP1* in Kulturproben vom Typ SK-BR-3 Behandlungs-assoziierte Expressions-Alterationen zeigten (siehe Abbildung 12 A), korrelierte eine Inkubation mit *TRAIL* und *atRA* sowohl alleine als auch in Kombination mit einer *Downregulation* des IAP-Vertreters *Survivin* (siehe Abbildung 12 B). Des Weiteren war für das proapoptotische *Bcl-2*-Protein *Bax*

keine nennenswerte quantitative Änderung feststellbar (siehe Abbildung 12 A). Für den Vertreter tBid hingegen konnte eine mit der Mono-Applikation von TRAIL und insbesondere atRA korrelierende sowie für das Protein Bak eine hauptsächlich atRAinduzierte Hochregulation beobachtet werden. Zudem war an SK-BR-3-Zellkulturen nach Exposition gegenüber atRA eine Reduktion der Bcl-2-Expression sowie nach Inkubation mit TRAIL eine Minderung der McI-1-Quantitäten detektierbar (siehe Abbildung 12 B). Wenngleich für die oben genannten Signaltransduktionskomponenten kein Kombinations-Effekt nachweisbar war, bestätigen die gezeigten Western-Blot-Ergebnisse dennoch die Hypothese einer Relevanz von Bcl-2- und Inhibitors-of-Apoptosis-Proteinen im Rahmen der Responsivität der SK-BR-3-Zelllinie gegenüber TRAIL- und atRA-vermittelten proliferationsinhibitorischen Effekten. In Saos-2-Zellen waren hingegen weder Behandlungs-abhängige Alterationen der Splice-Varianten des antiapoptotischen Regulators FLIP, noch der Splice-Varianten des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins Mcl-1 und des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bak nachweisbar. Entsprechend konnten die bisher charakterisierten TRAIL- und Retinoid-induzierten Kombinations-Effekte in Saos-2-Zellen weder auf eine durch die Repression von FLIP bedingte Steigerung der Caspase-Rekrutierung am DISC, noch auf eine durch die Regulation von Mcl-1 oder Bak vermittelte Alteration der Mitochondrien-Integrität zurückgeführt werden.

4.10 Einfluss der Kombination von *TRAIL* und Retinoiden auf die Viabilität nicht-maligner Zellverbände

Abschließend blieb zu klären, ob die für oben genannte Tumorzell-Typen nachgewiesenen *TRAIL*- oder/und Retinoid-vermittelten zytotoxischen und proliferationsinhibierenden Effekte auch in nicht-malignen Zellen entsprechender Gewebe-Entitäten auftreten. Zu diesem Zweck wurden mittels MTT-Test die Viabilitäten primärer Osteoblasten und mammärer Zellen der Linie MCF 10A, die Charakteristika duktaler luminaler Brustdrüsenepithelien aufweist, entsprechend der in Punkt 3.1 geschilderten Vorgehensweise untersucht. Anschließend wurden jeweils an definierten Konzentrations-Punkten die Dosis-abhängigen Viabilitäten der nicht-neoplastischen Zelllinie und der entsprechenden Tumorzell-Linie verglichen (siehe Abbildung 13).



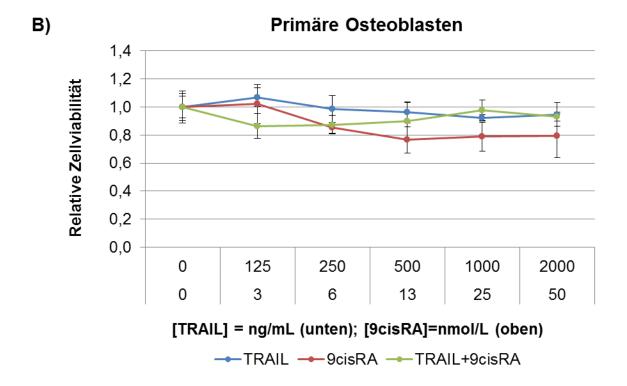


Abbildung 13. Relative Viabilitäten mammärer Brustdrüsen-Epithel-Zellen der Linie MCF 10A (A) und primärer Osteoblasten (B) in Abhängigkeit der Behandlung mit *TRAIL*, *atRA* bzw. *9cisRA* sowie deren Kombination. Nach fünftägiger Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von *TRAIL*, *atRA* bzw. *9cisRA* allein sowie mit deren Kombination wurde mittels MTT-Test deren Viabilität bestimmt.

MCF 10A-Zellen unterliegen je nach Kulturbedingungen insofern morphologischen Veränderungen, als dass bei spärlicher Konfluenz und geringer Proliferationsrate vor allem mesenchymale, bei dichter Konfluenz und hoher Proliferationsrate eher epitheliale Charakteristika dominieren [140]. Entsprechend erwies sich auch deren Suszeptibilität gegenüber TRAIL-induzierter Zytotoxizität als abhängig von der jeweiligen morphologischen Zustandsform, sodass die beobachtete Zellviabilitäts-Reduktion bei Konzentrationen von 40 ng/mL Werte zwischen 19% und 30% umspannnte. Hiermit war MCF 10A hinsichtlich der TRAIL-Sensitivität zwischen der TRAIL-resistenten Tumorzelllinie MCF7, die bei gleicher Konzentration eine 19%ige-, und der moderat TRAIL-responsiven Tumorzelllinie SK-BR-3, die bei gleicher Konzentration eine 44%-ige Viabilitäts-Reduktion aufwies, einzuordnen. Gegenüber einer Behandlung mit atRA zeigten sich MCF 10A-Zellen, deren Viabilität bei Dosen von 3200 nmol/L nahezu 100% betrug, resistent. Das Ansprechen auf eine Kombination von TRAIL und atRA ähnelte hingegen der TRAIL-resistenten Zelllinie MCF-7: die Viabilitäts-Reduktion bei TRAIL-Dosen um 40 ng/mL, kombiniert mit atRA-Dosen von 400-500 nmol/L, betrug hierbei jeweils ca. 27%. Gleiche Konzentrationen bedingten hingegen eine ca. 77%ige Reduktion der Viabilität von SK-BR-3-Zellen.

Primäre Osteoblasten hingegen erwiesen sich im Vergleich zu den Zelllinien Saos-2 und MG-63 als relativ resistent gegenüber *TRAIL*-induzierter Viabilitäts-Hemmung: während jene bei Konzentrationen von 12,5 ng/mL zwischen 4% und 7% lag, betrug sie für Saos-2-Zellen 37% sowie für MG-63-Zellen 89%. Im Übrigen ergaben sich Hinweise auf eine moderate Responsivität gegenüber *9cisRA*, die jedoch geringer als jene der Osteosarkom-Zellen blieb: Dosen um 1000 nmol/L bedingten eine Inhibition der Zellviabilität um ca. 2-21%, die jedoch für Saos-2-Zellen bei 37% sowie für MG-63-Zellen bei 27% lag. Die kombinierte Anwendung von *TRAIL* und *9cisRA* in Konzentrationen von 12,5 ng/mL und 500 nmol/L war in primären Osteoblasten mit einer Hemmung der Viabilität um 10-27% assoziiert, während in Saos-2-Zellen bereits für Dosen von 6,25 ng/mL und 500 nmol/L Werte um 55% sowie in MG-63-Zellen bereits für Dosen von 2,5 ng/mL und 500 nmol/L Werte um 47% erreicht wurden.

Oben genannte Beispiele vermochten zwar eine ausschließliche Tumorzellspezifität *TRAIL*- bzw. kombinierter *TRAIL*- und Retinoid-induzierter Zytotoxizität nicht zu bestätigen, die Responsivität der untersuchten nicht-malignen Zellen gegenüber jenen

Effekten erwies sich jedoch im Vergleich zu suszeptiblen Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zelllinien als sehr gering.

^{*} Die in Abbildung 12 B gezeigten *Western-Blot*-Ergebnisse wurden mit maßgeblicher Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Hongyu Liu, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, erhoben.

5 Diskussion

Im Jahr 2010 war das Mammakarzinom mit einem Anteil von 31% der Lokalisationen aller neu diagnostizierten malignen Neoplasien sowie mit einem Anteil von 17% aller Krebssterbefälle sowohl die häufigste Tumorentität als auch die häufigste Ursache Krebs-bedingten Versterbens der weiblichen Bevölkerung Deutschlands [8]. Ein zentrales Problem in der Therapie des Mammakarzinoms stellt mitunter das Risiko einer sich mit zunehmender Behandlungsdauer oder einer sich im Rahmen der eventuellen Progression des Tumors einstellenden Resistenz gegenüber zielgerichteten oder zytostatischen Pharmaka dar. Darüber hinaus existieren distinkte Subentitäten, die sich entweder initial refraktär gegenüber beispielsweise antiestrogenen oder HER2-Standardtherapeutika verhalten oder für antagonistischen die iene Behandlungsalgorithmen aufgrund fehlender Rezeptor-Expression nicht infrage kommen. In diesen Fällen bleibt die Anwendung "klassischer", nicht zielgerichteter Zytostatika die einzige Option der systemischen Pharmakotherapie [12, 13].

Das Osteosarkom ist die häufigste solide Neoplasie des Kindes- und Jugendalters, deren klinisches Outcome mitunter durch das histologische Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie, die Vollständigkeit der chirurgischen Resektion, die Existenz von Metastasen und das Auftreten von Rezidiven determiniert wird [14]. Entsprechend erweist sich insbesondere die Prognose der sogenannten poor responder sowie des metastasierten und/oder rezidivierten Osteosarkoms deswegen als ungünstig, weil bis dato weder Intensivierung, noch Modifikation aktueller chemotherapeutischer Behandlungsalgorithmen das Gesamtüberleben ienes Patientenkollektivs im Vergleich zum konventionellen Vorgehen signifikant verlängert hat [130-133].

Aus oben genannter Problematik der Chemoresistenz von Tumoren fortgeschrittener Stadien bzw. bestimmter Subentitäten ergibt sich sowohl für das Mammakarzinom als auch für das Osteosarkom die Notwendigkeit der Etablierung wirksamer und insbesondere für die genannten Patientenkollektive anwendbarer Therapiealternativen. Da sowohl eine Dosiserhöhung als auch die zusätzliche Verabreichung gängiger Zytostatika eine Aggravation unerwünschter Begleiterscheinungen wie Myelosup-

pression, Hepato-, Nephro-, Kardio- und Neurotoxizität bzw. eine Expansion des Nebenwirkungsprofils zur Folge hat, rücken insbesondere tumorselektivere und hiermit nebenwirkungsärmere Pharmaka in den Fokus des diesbezüglichen Forschungsinteresses [133, 149, 150]. Da sowohl für Retinoide als auch für TRAIL-Rezeptor-Agonisten das Potenzial einer Tumor-spezifischen Proliferationsinhibition bzw. Induktion von Apoptose bei gleichzeitig begrenzter systemischer Toxizität nachgewiesen ist, kommen Vertreter beider Substanzklassen zur Exploration alternativer Behandlungsschemata des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms infrage [4, 7, 57, 102]. Das generelle Konzept einer Kombination antikanzerogener Therapeutika basiert hierbei auf der Annahme, dass Erstens die Diversität ihrer Aktionswege einen Synergismus pharmakologischen antiproliferativer oder proapoptotischer Effekte bedingen kann, dass sich Zweitens aus der hieraus resultierenden Möglichkeit einer Dosisreduktion die Minimierung des Auftretens oder der Intensität von Nebenwirkungen der Einzelkomponenten ergibt und dass Drittens trotz eventueller Resistenz der Tumorzellen gegenüber einem Pharmakon die Effektivität der Therapie auf der Grundlage komplementärer Wirkmechanismen erhalten bleibt [7, 148].

Unter vorgenannten Gesichtspunkten wurden im Rahmen dieser Arbeit am in-vitro-Modell des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms Kombinationseffekte von rekombinantem humanen TRAIL und atRA bzw. 9cisRA auf die Integrität von Tumorzellverbänden sowie auf deren Proteinexpressions- und ggf. -aktivitätsprofile untersucht. Auf der Grundlage MTT-basierter Zellviabilitäts-Bestimmungen und anschließender Quantifizierung entsprechender Dosis-Effekt-Beziehungen nach Chou 148] konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß Talalay [147, Proliferationsinhibition durch kombinierte Applikation von TRAIL und Retinoiden in SK-BR-3-Mammakarzinomzellen und Saos-2-Osteosarkomzellen jeweils größer war als die Summe der Effekte der Einzelsubstanzen. Jene an der Hemmung der Zellvitalität beobachteten Tendenzen entsprachen sowohl den Tendenzen der DNA-Fragmentierung in SK-BR-3- als auch den Tendenzen der Caspase-3-Prozessierung und -Aktivierung in Saos-2-Zellen, sodass ein Zusammenhang TRAIL und Retinoidvermittelter antikanzerogener Wirkungen mit der Induktion von Apoptose nahe liegt. Als hiermit vereinbar erwies sich darüber hinaus die Hochregulation von DR5 in Proteinisolaten mit TRAIL und atRA behandelter Kulturen vom Typ SK-BR-3. Die Untersuchung des Kolonieformationsverhaltens von MCF7-, ZR-75-1-, und SK-BR-3-Mammakarzinom- und Saos-2-Osteosarkomzellen ergab des Weiteren, dass *TRAIL*, *atRA* und *9cisRA* bei alleiniger wie bei kombinierter Anwendung sowohl zytostatisch als auch zytotoxisch wirken. Da schließlich selbst hohe Konzentrationen jener Pharmaka sowohl an nicht-neoplastischen mammären Epithelzellen vom Typ MCF 10A als auch an primären Osteoblasten eine allenfalls moderate Proliferationsinhibition bedingten und zudem keinerlei Kombinationseffekte auftraten, kann eine tumorzellselektive Wirkung jenes in dieser Arbeit untersuchten pharmakotherapeutischen Konzepts angenommen werden.

5.1 Phänotyp-Abhängigkeit der *TRAIL*- und Retinoid-Responsivität von Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zellen

Bis auf MDA-MB-436-Zellen, deren Retinoid-Rezeptor-Status, und primäre Osteoblasten, deren Retinoid- und *DR*-Status unbekannt blieben, exprimierten sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß mindestens einen *DR* sowie *RAR*- und/oder *RXR*-Isoformen (siehe auchTabelle 2). Basierend auf der sich hieraus ergebenden Annahme einer potenziellen Reagibilität der betrachteten Zellkulturmodelle gegenüber *TRAIL* und Retinoiden, sollten jeweils deren Sensitivitäten in Abhängigkeit der Rezeptor-Expressions-Dichte und des Tumorzellphänotyps exploriert werden.

5.1.1 Mesenchymale Phänotypen zeigen TRAIL-Sensitivität

Die zusammenfassende Auswertung mehrerer Forschungsarbeiten zur Sensitivität von Malignomen verschiedener Entitäten ergab, dass sich ca. ein Drittel der untersuchten Kulturen humaner Tumorzellen resistent und ein weiteres Drittel moderat responsiv gegenüber *DR*-agonistischen Agentien verhielt [151]. Trotzdem ein Mindestmaß an *DR*-Expression die notwendige Bedingung einer potenziellen *DR*-vermittelten Apoptose-Induktion darstellt, konnte bis dato keine Korrelation der *TRAIL*-Responsivität mit der *TRAIL*-Rezeptor-Dichte auf der äußeren Membranoberfläche von Tumorzellen festgestellt werden [19].

Auch an den in dieser Arbeit betrachteten Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zelllinien war jene Korrelation nicht nachweisbar. Vielmehr stellte sich jedoch ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität gegenüber *TRAIL*-vermittelter Viabilitäts-Inhibition und morphologischen Kriterien, die insbesondere Tumorzellphänotypen

mesenchymaler und epithelialer Genese unterscheiden, dar (siehe auch Tabelle 2 und Abbildung 1). Demnach wiesen sämtliche der untersuchten Zellkulturmodelle mesenchymalen Phänotyps – MDA-MB-436, MDA-MB-231 und MG-63 – hohe *TRAIL*-Sensitivitäten auf, während sich epitheliale Zelllinien entweder resistent (MCF-7, T-47D, ZR-75-1, BT-474, BT-20) oder moderat responsiv (SK-BR-3, Saos-2) zeigten. Des Weiteren war offensichtlich, dass unter den *TRAIL*-resistenten Mammakarzinom-Kulturen sowohl ER-positive und *HER2*-amplifizierende als auch ER- bzw. *triplenegative* Zelllinien vertreten waren, während die als hoch sensitiv klassifizierte Gruppe lediglich *triple-negative* Subentitäten umfasste.

Entsprechende Forschungsergebnisse an Mammakarzinomzellen wurden bereits von den Arbeitsgruppen Rahman et al., Buchsbaum et al. und Chinnaiyan et al. erhoben und veröffentlicht [39, 152, 153]: demnach erwiesen sich zusammengefasst zehn von vierzehn triple-negativen sowie zwei von acht HER2-amplifizierenden Zelllinien als sensitiv und sämtliche ERα-positiven Kulturen als resistent gegenüber DR-vermittelter Zytotoxizität [53]. Auch die in weiteren experimentellen Studien von Oliver et al., Keane et al., Garimella et al., Zhang und Zhang, Kazhdan und Marciniak sowie Amm et al. erhobenen Daten untermauern die Hypothese einer vorrangigen Responsivität von triple-negativen Mammakarzinom-Zellen mit mesenchymalem Phänotyp gegenüber DRvermittelter Zytotoxizität sowie einem häufigen Auftreten von Resistenzen beim epithelialen bzw. ERα-positiven Phänotyp [154-159]. Im Gegensatz zu vorgenannten sowie den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen klassifizierten Singh et al. etwa Kulturen vom Typ MCF7 und T47D als semisensitiv sowie ZR-75-1 als sensitiv [54]. Diskrepanzen gründen sich womöglich sowohl auf die unterschiedlicher Methodiken zur Evaluierung von Zellviabilität und Apoptose-Induktion sowie hiermit einhergehenden Variationen in Liganden-Konzentration, Inkubationsdauer, initialer Zellzahl und Test-Sensitivität. Dem entsprechend erwiesen sich auch die eine Responsivität oder Non-Responsivität jeweils definierenden Grenzen und Abstufungen als untereinander nicht vergleichbar.

Als Determinanten der *TRAIL*-Suszeptibilität von Mammakarzinomzellen werden mitunter neben Polymorphismen und Mutationen der *DR*s auch Alterationen ihrer Expression auf der Zellmembran-Oberfläche diskutiert. Ein Hinweis für die entscheidende Rolle von *Caspasen* ist beispielsweise der Nachweis einer *Caspase*-3-

und Procaspase-8-Defizienz in MCF-7-Zellen, während suszeptible Mammakarzinom-Zelllinien einen zwölf- bis vierzehnfachen Anstieg der Caspase-Aktivitäten zeigten. Klinische Relevanz erlangt diese Erkenntnis unter dem Aspekt, dass ein Anteil von 75% untersuchter Gewebeproben humaner mammärer Neoplasien keine Caspase-3-mRNA aufwies. Die hohe TRAIL-Sensitivität von MDA-MB-231-Zellen wurde zudem auf eine vergleichbar geringe Expression des Caspase-8-Strukturhomologs FLIP zurückgeführt [19, 32, 39, 53, 157, 158, 160, 161]. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Relevanzen o.g. Signaltransduktionskomponenten für die DR- und Retinoid-vermittelte Zytotoxizität in Mammakarzinom-Zelllinien werden in den Abschnitten 5.3 und 5.4 weiterführend diskutiert. Als prädiktive Marker einer Suszeptibilität neoplastischer mammärer Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose und Proliferationsinhibition erwiesen sich außerdem die Proteine Vimentin und Moesin, deren Expressionshöhe mit dem Ausprägungsgrad mesenchymaler Phänotypen korreliert und entsprechend während des Prozesses der epithelial-mesenchymalen Transition einer Tumorzelle zunimmt [39, 53, 114, 116, 162]. Tatsächlich zeigten die in dieser Arbeit als TRAILsensitiv klassifizierten Kulturen vom Typ MDA-MB-231 und MDA-MB-436 eine vergleichbar hohe Expression jener mesenchymalen Marker und repräsentieren zudem Zelllinien eines Tumorgewebes, das einer solchen phänotypischen Transition unterlag [39, 55]. Da derartige morphologische Veränderungen insbesondere im Rahmen der Progression von Malignomen auftreten und etwa mit der Etablierung von Resistenzen gegenüber Standard-Pharmakotherapien einhergehen, kann das Potenzial von DR-Agonisten wie TRAIL auch für die Behandlung fortgeschrittener Mammakarzinome diskutiert werden [117].

Auch beim Osteosarkom stellt das Auftreten von *TRAIL*-Resistenzen einen limitierenden Faktor der klinischen Anwendbarkeit *DR*-aktivierender Liganden oder Antikörper als Monotherapie dar. Im Rahmen von in-vitro-Experimenten zur *TRAIL*-vermittelten Viabilitäts-Reduktion und Apoptose-Induktion an Osteosarkom-Zellkulturen konnten vier von sieben bzw. lediglich eine von sechs Zelllinien als sensitiv eingestuft werden. Den teils widersprüchlichen Studienergebnissen kann entnommen werden, dass MG-63-Kulturen wenig bis hoch responsiv und Saos-2-Kulturen geringfügig responsiv bis resistent gegenüber *TRAIL*-induzierter Zytotoxizität reagierten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten ergaben ähnliche Tendenzen und verdeutlichten darüber hinaus, dass das Ausmaß der *TRAIL*-vermittelten Viabilitäts-

Inhibition in mesenchymalen Osteosarkomzellen vom Typ MG-63 unter allen betrachteten Tumorzelllinien am größten war. In Zusammenschau mit der lediglich moderaten *TRAIL*-Responsivität epithelialer Saos-2-Zellen lag zwar die Annahme eines Entitäts-übergreifenden Zutreffens oben genannter Phänotyp-Sensitivitäts-Beziehung nahe, ein Zusammenhang zwischen morphologischen Charakteristika und *TRAIL*-Suszeptibilität ließ sich jedoch aus den bisher veröffentlichten Ergebnissen nicht ableiten. Als ursächlich für die Existenz von *TRAIL*-Resistenzen beim Osteosarkom wurden mitunter Alterationen des Expressionsverhältnisses von *Death*- und *Decoy*-Rezeptoren sowie eine Hochregulation von *FLIP* beschrieben. In einer weiteren Studie hingegen war in diesem Zusammenhang keine Korrelation mit der basalen mRNA-Expression von *FLIP* und *DRs* nachweisbar [56, 57, 163]. Die Relevanz jener Signaltransduktionskomponenten für *TRAIL*-induzierte zytotoxische Effekte beim Osteosarkom wird in den Abschnitten 5.3 und 5.4 weiterführend diskutiert.

5.1.2 Epitheliale Phänotypen zeigen Retinoid-Sensitivität

Die in Abschnitt 4.1 präsentierten Daten zur Retinoid-Responsivität der in Tabelle 2 aufgeführten Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zellkulturen ergaben mitunter Korrelationen hoher RARα-Expression und hoher atRA- bzw. 9cisRA-vermittelter Viabilitäts-Inhibition. Da unter den responsiven wie unter den refraktären Mammakarzinom-Zellen sowohl ERα-positive als auch ERα-negative Phänotypen vertreten waren, konnte der vielfach diskutierte Zusammenhang von Retinoid-Suszeptibilität und ERα-Status nicht bestätigt werden. Auch Fitzgerald et al. zeigten, dass sich RARa-positive, ERa-negative Mammakarzinom-Zelllinien wie SK-BR-3 und Hs578T sensitiv gegenüber Retinoid-induzierter Proliferationshemmung verhielten [94, 164]. Immunhistochemische Analysen an 70 Gewebeproben humaner Mammakarzinome ergaben des Weiteren keinen Bezug der ERα- zur RAR-Expression [119]. Dem entsprechend konnte das präventive Potenzial von Retinoiden in Mausmodellen der mammären Karzinogenese auch an ERa-negativen Tumoren festgestellt werden [165].

Die Retinoid-sensitivsten Zelllinien SK-BR-3, T-47D und ZR-75-1 wiesen neben hohen *RAR*α-Expressionsdichten sämtlich epitheliale Morphologien auf. Mammakarzinom-kulturen vom Typ MCF7 hingegen, die zwar sowohl durch einen epithelialen Phänotyp als auch durch eine hohe *RAR*α-Dichte charakterisiert sind, verhielten sich entgegen

zahlreichen bereits veröffentlichten Forschungsergebnissen atRA-resistent. Auch Bacus et al. beschrieben eine vergleichbar geringe Sensitivität der MCF7-Zelllinie gegenüber atRA-induzierter Proliferationsinhibition und Differenzierung [166]. Weitere Experimente zeigten zudem, dass etablierte Mammakarzinom-Zelllinien – hierunter insbesondere MCF7 – abhängig von den gewählten Kulturbedingungen unterschiedliche Morphologien ausbilden und dass deren hiermit einhergehende Heterogenität Diskrepanzen zwischen an verschiedenen Kulturen des gleichen Zelltypus gemessenen Effekten bedingen kann [165, 167-169]. Trotz der Offensichtlichkeit einer Assoziation hoher Retinoid-Sensitivitäten mit epithelialen Phänotypen erwiesen sich epitheliale, RARapositive Mammakarzinom-Zellen der Linien BT-474 und BT-20 als refraktär. Zudem wiesen sämtliche mesenchymale Zelllinien unabhängig vom RARα-Status – hierunter auch die einzige untersuchte RARα-defiziente Zelllinie MDA-MB-231 - Retinoid-Resistenzen auf. Demnach lässt sich zusammenfassen, dass RARα-Positivität zwar Voraussetzung für eine potenzielle Retinoid-Responsivität von Mammakarzinom-Zellen darstellt. Darüber hinaus vermag jene Suszeptibilität einiger epithelialer Phänotypen auch mit der RARα-Expressionsdichte zu korrelieren. Für die atRA- und 9cisRAinduzierte Viabilitäts-Reduktion müssen jedoch auch andere Determinanten in Betracht gezogen werden. Ähnliche Erkenntnisse lieferte eine von van der Leede et al. veröffentlichte Studie zur Exploration der atRA-Sensitivität von Tumor-Zelllinien diverser Entitäten: der Nachweis einer Expression von RAR- und RXR-Isoformen an Zelllinien geringer Retinoid-Responsivität wie BT-20 und Saos-2 untermauerte hierbei die These, dass Retinoid-Resistenzen nicht nur auf eine Defizienz von Retinoidrezeptoren zurückführbar sind [144]. Die Tatsache, dass atRA-refraktäre Zelllinien der myeloischen Leukämie, des Kolonkarzinoms und des Mammakarzinoms mit geringer RARα-Dichte bzw. RARα-Defizienz infolge exogener Expression des Rezeptors atRA-responsiv reagierten, bestätigt dennoch eine Relevanz der Expressionshöhe jener Isoform für die Antikanzerogenität der Retinoide. Des Weiteren gelang der Nachweis einer geringeren Expression von RARa und insbesondere RARB in Biopsieproben invasiver bzw. schlecht differenzierter humaner Mammakarzinome im Vergleich zu DCIS-Läsionen sowie zu umgebendem, pathologisch unauffälligem mammären Gewebe. Zusammenschau mit der Erkenntnis, dass zahlreiche Zelllinien und Gewebeproben verschiedener Tumorentitäten eine RARβ-Defizienz aufweisen, ergibt sich die Annahme, dass sowohl die mammäre Karzinogenese als auch die Progression mammärer Neoplasien vom *DCIS* zum invasiven Karzinom bzw. von einer low-gradezur high-grade-Läsion mit einer fortschreitenden *RAR*β-Depletion einhergehen kann. Da die Retinoid-vermittelte Apoptose-Induktion in Mammakarzinom-Zelllinien mitunter auf eine aus der Ligandierung und Aktivierung von *RAR*α resultierende *RAR*β-Induktion zurückgeführt wird, kann eine *RAR*β-Defizienz, die sich beispielsweise auf dessen fehlende Induzierbarkeit gründet, als Ursache einer trotz *RAR*α-Positivität bestehenden Retinoid-Resistenz diskutiert werden. Obgleich im Zusammenhang mit der Kanzerogenese sowie der Retinoid-Suszeptibilität von Tumorzellen neben Expressions-Alterationen auch Defekte der Retinoid-Rezeptor-Struktur und –Funktion bzw. der Rezeptor-codierenden Gene vermutet werden, ist deren diesbezügliche quantitative und qualitative Relevanz aktuell nicht abschließend evaluiert [118, 119, 170-172].

Die Tatsache, dass von den in dieser Arbeit untersuchten in-vitro-Modellen des Mammakarzinoms insbesondere *triple-negative* – hierunter auch die mesenchymalen – Zelllinien Retinoid-Resistenzen zeigten und dass gerade Subentitäten dieser Charakteristika aufgrund der Expression von Markerproteinen wie Vimentin und Moesin als Teilstadien im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Plastizität verstanden werden, gibt Anlass zu der Annahme eines Zusammenhangs jener Progressions-assoziierten phänotypischen Transition und dem Grad der Suszeptibilität gegenüber NHR-basierter Pharmakotherapie. Tatsächlich konnte an in-vitro-Modellen wie an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben invasiver Mammakarzinome gezeigt werden, dass die Expression mesenchymaler Marker sowohl Ausdruck einer Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp sein kann als auch mit dem Grad der Dedifferenzierung, dem Potenzial zur Metastasierung, der Defizienz von Nukleohormonrezeptoren wie ERα, *RAR*α und *RAR*β und konsekutiv mit der Resistenz gegenüber NHR-modulierenden Pharmaka wie Tamoxifen oder Retinoiden korreliert [39, 114-117, 162, 172, 173].

Da sich von den untersuchten Osteosarkom-Kulturen die epitheliale Zelllinie Saos-2 als moderat sensitiv und die mesenchymale Zelllinie MG-63 als resistent gegenüber *9cisRA* erwiesen, stellte sich die Frage eines Entitäts-übergreifenden Zutreffens der bereits anhand von Mammakarzinom-Modellen erschlossenen Hypothese zur Morphologie-Suszeptibilitäts-Beziehung. Weitere Studien zur Exploration der Retinoid-Responsivität von Osteosarkom-Zelllinien ergaben jedoch, dass einerseits *9cisRA* die Proliferation

von Zellen gemischter Morphologie des Typs 143B inhibiert und dass andererseits Epithel-ähnliche TE-85-Kulturen lediglich marginal responsiv reagierten. Die Datenlage zum Grad der Retinoid-vermittelten Proliferationsinhibition und Apoptose-Induktion in MG-63- und Saos-2-Zellen stellt sich zudem kontrovers dar. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Forschungsergebnisse von van der Leede et al., die mitunter zeigten, dass Zelllinien fibroblastischen Phänotyps durchaus Retinoid-sensitiv reagieren und dass sich ein Großteil der untersuchten epithelialen Tumorzellen verschiedener Entitäten als Retinoid-resistent erwies, kann die Annahme eines Entitäts-übergreifenden Zusammenhangs zwischen epithelialer Morphologie und hoher bzw. mesenchymaler Morphologie geringer Suszeptibilität gegenüber Retinoid-vermittelten und antikanzerogenen Wirkungen nicht bestätigt werden [102, 134, 137, 144].

5.1.3 Relevanz der HER2-Überexpression

Studien zur histopathologischen, prognostischen und therapeutischen Relevanz von HER2 beim Mammakarzinom ergaben, dass eine Amplifikation jener Rezeptor-Tyrosinkinase mit erhöhter Zellproliferation und -motilität, mit der Suppression von Apoptose sowie mit der Akzeleration von Angiogenese, Tumorinvasivität, -progression und Metastasierung assoziiert ist und mit einem verkürzten Intervall bis zum Rezidiv sowie einer geringeren Gesamtüberlebensdauer einhergeht. Zudem vermitteln HER2initiierte Signalwege mitunter Chemoresistenzen [101, 117, 120, 174]. Dem entsprechend und in Übereinstimmung mit den im Abschnitt 4.1 präsentierten Daten beschrieben Tari et al. eine Resistenz der HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie BT-474 gegenüber atRA. Zudem bedingte die HER2-Transfektion von MCF7-Kulturen eine Abnahme der Retinoid-Sensitivität. Die Applikation des anti-HER2-Antikörpers Trastuzumab führte zudem in BT-474-Zellen zu einer Resensitivierung [175] bzw. zu einer synergistischen Proliferationshemmung [91] und resultierte in einer Erhöhung des Anteils Zellzyklus-arretierter Tumorzellen. Entgegen der Hypothese einer HER2-vermittelten Retinoid-Resistenz von Mammakarzinom-Zellen verwiesen weitere Veröffentlichungen sowohl auf eine Hochregulation des RARa infolge HER2-Stimulation als auch auf eine Retinoid-vermittelte Downregulation von HER2 in SK-BR-3-, BT-474- und MCF7-Zellen, die darüber hinaus mit einer Proliferationsinhibition und der Induktion von Apoptose assoziiert war [91, 101, 166, 176, 177]. Jene offensichtliche Kontroversität der Datenlage zu Auswirkungen einer HER2-Amplifikation auf die Suszeptibilität von Mammakarzinom-Zelllinien gegenüber Retinoiden erlaubt folglich keine abschließende Erklärung der Sensitivitätsunterschiede zwischen BT-474- und SK-BR-3-Zellen, sondern lässt lediglich vermuten, dass anstatt eines generellen Prinzips der Interaktion zwischen *HER2*- und *RAR*α-vermittelten Signalwegen vielmehr Zelltyp-spezifische Mechanismen existieren.

Unter Berücksichtigung der hier geschilderten Datenlage ergab sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage nach Zusammenhängen zwischen HER2-Status und TRAIL-Sensitivität der untersuchten Zellkulturmodelle: unter den HER2-amplifizierenden Zelllinien erwies sich schließlich SK-BR-3 als moderat responsiv, BT-474 hingegen als resistent. Auch die Gruppe er HER2-normalen Mammakarzinom-Zelllinien beinhaltete sowohl TRAILsensitive als auch -refraktäre Vertreter. Rahman et al. und Chinnaiyan et al. wiesen außerdem an insgesamt zwei von acht verschiedenen HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Kulturen eine TRAIL-Sensitivität nach. Hierbei ergaben sich für HER2-amplifizierende, TRAIL-sensitive Tumorzellen signifikant höhere IC50-Werte als für triple-negative, mesenchymale TRAIL-sensitive Phänotypen. Dem entsprechend verdeutlichen auch die in den Abschnitten 3.1 und 3.2 vorgestellten Daten, dass bei gleicher TRAIL-Konzentration die Viabilitäts-Inhibition moderat responsiver SK-BR-3-Zellen geringer war als jene der sensitiven Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 [39, 53, 153]. Oben genannte Ergebnisse lassen dennoch erkennen, dass der HER2-Status nicht als alleinige Ursache der disparaten TRAIL-Responsivitäten verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien infrage kommt.

Die klinische Relevanz des *HER2*-Status von Osteosarkomen wird aktuell kontrovers diskutiert. Zahlreiche Untersuchungen sowohl an Patientenmaterial als auch an in-vitro-Modellen ergaben, dass 32% bis 43% der Gewebeproben humaner Osteosarkome sowie acht von zehn Osteosarkom-Zelllinien hohe Quantitäten des *HER2*-Proteins aufwiesen. *HER2*-Positivität war sowohl an mesenchymalen als auch an epithelialen Phänotypen nachweisbar. Anders als beim Mammakarzinom wurde der Rezeptor ausschließlich im Zytoplasma und nicht an der Zellmembran-Oberfläche detektiert. Zudem war die *HER2*-Expression in Osteosarkom-Zelllinien deutlich geringer als in *HER2*-amplifizierenden Mamma- und Ovarialkarzinom-Kulturen. Eine Gen-Amplifikation als Ursache hoher *HER2*-Quantitäten war weiterhin nicht nachweisbar. Auch am Osteosarkom wurden Korrelationen einer hohen *HER2*-Expression mit vermindertem histologischen Ansprechen auf Chemotherapie, mit der Expression des P-

Glycoproteins, das Pharmakoresistenzen vermittelt, sowie mit einer hohen Rezidivrate und einer kurzen ereignisfreien und Gesamtüberlebensdauer festgestellt [15, 16, 145]. Anninga et al. hingegen fanden an entsprechenden Biopsieproben und Resektionspräparaten keine Überexpression von *HER2*. Weitere Arbeiten proklamierten wiederum einen positiven Einfluss der *HER2*-Überexpression auf die Überlebensdauer von Osteosarkom-Patienten. Laut aktueller Datenlage bleibt folglich die Relevanz von *HER2* für die Tumorbiologie des Osteosarkoms unklar [178].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass von den untersuchten Osteosarkom-Kulturmodellen, die beide relevante Quantitäten an *HER2*-Protein exprimieren, Saos-2-Zellen sowohl gegenüber *TRAIL* als auch gegenüber *9cisRA* geringfügig bis moderat responsiv reagierten, MG-63-Zellen hingegen bei hoher *TRAIL*-Sensitivität *9cisRA*-resistent waren. Eine Relevanz des *HER2*-Status für *TRAIL*- und Retinoid-vermittelte Effekte an Osteosarkomzellen lässt sich folglich nicht ableiten.

5.2 Kombinationseffekte von *TRAIL* und Retinoiden auf die Vitalität von Mammakarzinom- und Osteosarkomzellen

Da eine Monotherapie maligner Neoplasien mit TRAIL oder DR-agonistischen Antikörpern im Rahmen klinischer Studien bisher lediglich begrenzte Wirksamkeit zeigte, sind aktuell Kombinationen DR-basierter Pharmaka mit weiteren zytostatischen oder zytotoxischen bzw. spezifisch antikanzerogenen Wirkstoffen Gegenstand klinischer Untersuchungen [19, 179]. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten stellten Singh et al. weiterhin fest, dass sich über 50% der bisher untersuchten Brustkrebs-Zelllinien resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose-Induktion und Viabilitäts-Inhibition verhielten, dass jedoch die Kombination mit chemotherapeutischen Wirkstoffen eine Sensitivierung evozierte [54]. Experimentelle Studien an gängigen Mammakarzinom-Zelllinien wie MCF-7, T47D, ZR-75-1, BT-474, SK-BR-3 MDA-MB-231 sowie an murinen Xenograft-Modellen ergaben und synergistische bzw. die TRAIL-Wirkung verstärkende Effekte von Kombinationsschemata mit Paclitaxel, Etoposid, Camptothecin, Doxorubicin, 5-Fluorouracil sowie Tamoxifen und Trastuzumab. Mechanismen der Augmentation der TRAIL-Responsivität umfassten hierbei die Hochregulation von DR4 und DR5 sowie die Alteration jener Apoptose-modulierenden Signaltransduktionskomponenten, die eine Akzeleration intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Prozesse bedingen. Hierzu gehörten mitunter

Proteine der *Bcl-2-*Familie, *Caspasen* sowie Inhibitors of Apoptosis (siehe Abschnitt 5.3) [54, 154, 179-182]. Auch Osteosarkom-Zellen geringer TRAIL-Suszeptibilität zeigten nach kombinierter Inkubation mit Doxorubicin, Cisplatin oder Etoposid erhöhte Responsivitäten. Die Anwendung von TRAIL und einem der o.g. Chemotherapeutika resultierte zudem einer synergistischen Apoptose-Induktion [57]. Die Tatsache, dass derartige Schemata auch in einigen nicht-malignen Zelllinien synergistische Zytotoxizität hervorriefen, gab jedoch Anlass zur Exploration potenzieller Kombinationstherapeutika höherer Tumorzellspezifität [154]. Wie in den Abschnitten 2.4.3, 2.4.4 und 2.6 geschildert, haben Retinoide mitunter präventive Funktion im Rahmen von Kanzerogenese-Prozessen, induzieren an Tumorzellen Differenzierungsprozesse und triggern antiproliferative und proapoptotische Signalwege [183]. Dennoch erwies sich die klinische Anwendbarkeit von Retinoiden in der Therapie von Malignomen sowohl aufgrund des Auftretens von Resistenzen als auch aufgrund der systemischen Toxizität der für eine messbare antikanzerogene Wirkung erforderlichen Dosen als limitiert. Hierzu sei erwähnt, dass die atRA- und 9cisRA-Plasmakonzentrationen beim Menschen 4 bis 14 nmol/L bzw. unter 1 bis 9 nmol/L betragen [184] und dass Studien zur Pharmakokinetik und Toxizität von atRA und 9cisRA an gesunden Probanden sowie an Patienten mit malignen Neoplasien maximal tolerierbare Dosen von 140 bis 150 mg/m² pro Tag für die orale bzw. jeden zweiten Tag für die i.v.-Applikation ergaben. Die entsprechenden maximalen Retinoid-Plasmakonzentrationen betrugen 0,6 µmol/L für die orale bzw. 47 µmol/L für die intravenöse Verabreichung [185-188].

Experimentelle Untersuchungen zur Retinoid-vermittelten Proliferationsinhibition am invitro-Modell das Mammakarzinoms zeigten, dass erst atRA- bzw. 9cisRA-Konzentrationen ab 1 μ M eine mindestens fünfzigprozentige Reduktion des Wachstums von T47D-, ZR-75-1- und SK-BR-3-Kulturen bedingen. An BT-474-Zellen waren für den gleichen Effekt Dosen von 10 μ M und für MDA-MB-231 Dosen weit über 10 μ M erforderlich. Entsprechende Angaben für Mammakarzinom-Zellen vom Typ MCF-7 schwankten zwischen 100nM und 25 μ M [91, 97, 166, 175, 176]. Die in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte für die Zelllinien T47D, ZR-75-1, BT-474 und MCF-7 überschritten die oben angegebenen Konzentrationen von 1 μ M bzw. 10 μ M und 25 μ M. Die IC_{50} für SK-BR-3-Zellen lag hingegen bei lediglich 454 nmol/L (atRA) bzw. 161 nmol/L (atRA) (siehe auch Tabelle 3). Jene Diskrepanzen oben genannter experimenteller Daten gründen sich womöglich sowohl auf Sensitivitätsunterschiede der

verschiedenen angewandten Methoden zur Bestimmung der Zellviabilität wie z.B. MTT, WST und Zellzahlbestimmung, als auch auf Arbeitsgruppen-individuelle Alterationen des Proliferationsverhaltens der verwendeten Zelllinien, die sich mitunter aus abweichenden Kultur- und Versuchsbedingungen ergeben haben können. Zusammenfassend lagen die meisten der in dieser sowie in weiteren Arbeiten zur Exploration der Retinoid-Sensitivität von Mammakarzinom-Zelllinien ermittelten IC_{50} -Werte im einbis zweistelligen mikromolaren Bereich. Entsprechende Plasma-konzentrationen beim Menschen überschritten womöglich die obere Grenze jener Messwerte, die für maximal tolerierbare orale Dosen von atRA oder 9cisRA bereits ermittelt worden sind.

An in-vitro-Modellen des Osteosarkoms stellten Dozza et al. fest, dass in Saos-2-, MG-63- und U2OS-Zellen erst Konzentrationen zwischen 40 und 80 μM eines synthetischen atRA-Derivates moderate zytotoxische Effekte hervorriefen [134]. Haydon et al. hingegen wiesen an den Zelllinien MG-63- und TE-85 eine lediglich marginale Responsivität gegenüber 9cisRA in 100μ-molarer Konzentration nach. Die zusätzliche Applikation eines PPARγ-Liganden resultierte zwar in einer synergistischen Apoptose-Induktion [102, 137], die hierfür erforderlichen Retinoid-Konzentrationen von 20 bis 50 μM erweisen sich dennoch im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit als grenzwertig.

Die Etablierung von Kombinationsschemata, die eine weitere Reduktion der Retinoid-Dosen ermöglichen, ist daher für die o.g. Entitäten von klinischem Interesse.

Da Retinoide zudem Komponenten der TRAIL-Signaltransduktion regulieren, stellte sich die Frage nach der Wirksamkeit einer Kombination von Retinoiden mit TRAIL. An den in dieser Arbeit angewandten in-vitro-Modellen des Mammakarzinoms und des Osteosarkoms bedingten schon atRA- bzw. 9cisRA-Konzentrationen zwischen 13 nmol/L und 1 μ Mol/L eine synergistische Inhibition der Proliferation. Darüber hinaus konnten für die Zelllinien ZR-75-1, T-47D, SK-BR-3, Saos-2 und MG-63 die IC_{50} -Werte der jeweils applizierten Retinoide durch simultane Inkubation mit TRAIL auf 1/3 bis 1/1000 der erforderlichen Einzeldosis reduziert werden. Umgekehrt bedingten atRA bzw. 9cisRA an den Zelllinien MCF-7, T-47D, ZR-75-1, SK-BR-3 und Saos-2 eine Senkung der jeweiligen IC_{50} für TRAIL auf 1/4 bis 1/17 der Ausgangsdosis. Die anhand des MTT-Tests gemessene durch Retinoid- und TRAIL- sowie deren Kombination vermittelte Proliferationsinhibition konnte anhand des Clonogenic Assay

sowohl bestätigt als auch auf zytostatische und zytotoxische Mechanismen zurückgeführt werden. Am Beispiel der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3, die moderate Responsivitäten gegenüber TRAIL und Retinoiden zeigte, war für jede der Einzelsubstanzen mittels TUNEL-Assay eine Fragmentierung nukleärer DNA und mittels Cell Death Detection ELISAPLUS die Existenz von Nukleosomen im Zytoplasma detektierbar. Jene Korrelate nukleärer Desintegration, die mitunter als Indikatoren stattgehabter Apoptose-Prozesse aufgefasst werden, traten bereits bei TRAIL-Konzentrationen von 5 ng/mL und 40 ng/mL sowie bei atRA-Konzentrationen von 50 nmol/L bzw. 400 nmol/L auf (siehe auch Abbildung 6 und Abbildung 7). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass sowohl TRAIL als auch atRA bereits als Einzelsubstanzen Apoptose induzieren. Darüber hinaus bedingt deren Kombination in jeweils oben angegebenen Dosen eine relevante weitere Zunahme sowohl der nukleären DNA-Fragmentierung als auch der zytoplasmatischen Nukleosomen-Anreicherung. Zwar wiesen Offterdinger et al. in SK-BR-3-Zellen ebenfalls eine atRA- und 9cisRAvermittelte Induktion von Apoptose nach, allerdings wurden hierzu 10µmolare-Konzentrationen sowie zur Detektion die Annexin-V-Markierung angewandt. Cuello et. al stellten weiterhin fest, dass TRAIL in einer Konzentration von 1 µg/mL zu einer relevanten Elevation der Fraktion apoptotischer SK-BR-3-Zellen führte. Hierzu kann argumentiert werden, dass jene Effekte bei einer relativ kurzen Inkubationsdauer von 16h solch hohe TRAIL-Konzentrationen erfordern. Ob atRA, 9cisRA und TRAIL auch in geringeren Dosen und ggf. nach längeren Inkubationszeiten einen relevanten Anteil apoptotischer Zellen bedingen, wurde im Rahmen jener Arbeiten nicht untersucht [176, 182].

Dass Retinoide und *TRAIL* sowohl in der Proliferationsinhibition als auch in der Apoptose-Induktion Kombinations-Effekte zeigen, wurde hingegen bereits an in-vitro-Modellen anderer Tumorentitäten nachgewiesen. In Zelllinien des nicht-kleinzelligen Bronchial- sowie des Prostatakarzinoms resultierte beispielsweise die Applikation des synthetischen Retinoids CD437 in einer Augmentation der *TRAIL*-induzierten Apoptose [85]. Auch in Ovarialkarzinom- bzw. in Ewing-Sarkom-Zellen resultierte die Kombination von *TRAIL* mit 4HPR (Fenretinid), einem semisynthetischen Vertreter der Retinoide, in einer Erhöhung der *TRAIL*-vermittelten Zytotoxizität bzw. in einer synergistischen Reduktion der Viabilität [87, 135]. Die Tumorzellspezifität jener Effekte stellt zudem einen Vorteil gegenüber der konventionellen Standard-Chemotherapie sowie gegenüber

einer kombinierten Applikation von TRAIL und Zytostatika dar. Die Tatsache, dass die jeweiligen IC_{50} -Werte für atRA und 9cisRA durch Addition von TRAIL auf 1/3 bis 1/1000 der als Monotherapeutikum erforderlichen Dosis gesenkt werden konnten, eröffnet die Möglichkeit der Nutzung jener vielfach beschriebenen antikanzerogenen Retinoid-Wirkungen innerhalb eines klinisch tolerablen Plasmakonzentrationsbereiches. Umgekehrt lässt die Retinoid-vermittelte Senkung der IC_{50} -Werte für TRAIL auf 1/4 bis 1/16 der Einzeldosen vermuten, dass insbesondere an Zelllinien moderater bis geringer TRAIL-Responsivität die zusätzliche Applikation von atRA bzw. 9cisRA eine zumindest partielle Reaktivierung TRAIL-induzierter tumorzelltoxischer Wirkungen bedingen kann. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen und diskutierten in-vitro-Daten liefern demnach Anhaltspunkte für eine klinische Relevanz jener untersuchten Substanzkonstellation, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit der Senkung effektiver Dosen zum Zweck der Reduktion Substanz-spezifischer Nebenwirkungen.

5.2.1 Kombinationseffekte an Zelllinien mesenchymalen Phänotyps

verfügbarer Das weite Spektrum an Morphologien in-vitro-Modelle des histopathologische Mammakarzinoms, Untersuchungen humanen Tumorgewebes sowie klinische Verlaufsdaten weisen sowohl auf die Existenz primär mesenchymaler Phänotypen, als auch auf die Transition primär epithelialer zu Mesenchym-ähnlichen Neoplasien hin. Jener Konversionsprozess wird mitunter als Korrelat der Tumorprogression aufgefasst, da er mit der Entwicklung von Resistenzen gegenüber gezielten Behandlungsansätzen, jedoch auch gegenüber konventionellen Chemotherapeutika einhergehen kann [114]. Die hiermit verbundenen Limitationen in der pharmakologischen Behandlung geben demnach Anlass zur Etablierung neuer therapeutischer Ansätze, die insbesondere jene Subentitäten betreffen. Sowohl die in dieser Arbeit als auch die von Rahman et al. erhobenen in-vitro-Daten verdeutlichten bereits, dass TRAIL insbesondere die Proliferation triple-negativer Brustkrebs-Zelllinien mesenchymaler Morphologie inhibiert [39]. An Mausmodellen mesenchymaler mammärer Neoplasien waren zudem additive bis synergistische zytotoxische Wirkungen einer Therapiekonstellation aus DR-agonistischen Pharmaka und Paclitaxel, Doxorubicin oder Tyrosinkinase-Inhibitoren nachweisbar [152, 155, 156, 159]. Entgegen jenen beobachteten Kombinationseffekten resultierte die zusätzliche Applikation von atRA in Mammakarzinom-Zellen der Linie MDA-MB-231 nicht in einer Zunahme der TRAIL-vermittelten Viabilitäts-Inhibition.

Auch unter den verfügbaren Osteosarkom-Zelllinien existieren sowohl epitheliale als auch mesenchymale Phänotypen. Wie die Abbildung 4 B und C zeigen, bedingte die simultane Applikation von *atRA* oder *9cisRA* keine Steigerung der *TRAIL*-induzierten Proliferationshemmung der mesenchymalen Osteosarkom-Zelllinie MG-63.

An den in dieser Arbeit untersuchten mesenchymalen Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MG-63 ließ sich eine hohe *TRAIL*-Suszeptibilität bei gleichzeitiger Retinoid-Resistenz nachweisen. Da MDA-MB-231 und MG-63 dennoch Retinoid-Rezeptoren exprimieren und folglich eine potenzielle Reagibilität gegenüber Retinoiden anzunehmen ist, ergab sich die Frage nach einer Re-Induzierbarkeit Retinoid-vermittelter Wirkungen bzw. nach einem Synergismus durch Addition von *TRAIL*. Die Kurvenverläufe der *TRAIL*- und der Kombinations-induzierten Dosis-abhängigen Viabilitätsreduktion zeigten an einander entsprechenden Messpunkten keine relevanten Unterschiede, sodass zusammenfassend die Wirkung der Kombinationsbehandlung jener von *TRAIL* als Einzelsubstanz entsprach. Weder ein Synergismus noch eine *TRAIL*-vermittelte Retinoid-Sensitivierung waren nachweisbar. Unter Berücksichtigung der hohen *TRAIL*-Responsivität oben genannter in-vitro-Modelle sowie der Tatsache, dass eine Kombination mit Retinoiden zu keiner weiteren Reduktion der Viabilität führte, kann die Suffizienz einer *TRAIL*-Monotherapie mesenchymaler Subentitäten *triplenegativer* Mammakarzinome und evtl. Osteosarkome vermutet werden.

5.2.2 Kombinationseffekte an Zelllinien epithelialen Phänotyps

Wie Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen, erwiesen sich die im Rahmen dieser Arbeit angewandten in-vitro-Modelle epithelialer Tumoren als moderat responsiv bis resistent gegenüber TRAIL. Das Konzept einer Reaktivierung bzw. Intensivierung der TRAILinduzierten Tumorzelltoxizität in Form einer Sensitivierung oder eines Synergismus durch Addition von Chemotherapeutika ist daher Gegenstand zahlreicher experimenteller Studien. An den epithelialen Mammakarzinom-Zelllinien T-47D, ZR-75-1, BT-474 und MDA-MB-453 resultierte insbesondere die Kombination DRagonistischer Pharmaka mit Doxorubicin, 5-Fluorouracil oder Bortezomib in einer synergistischen Apoptose-Induktion, während an Kulturen eines MDA-MB-231-Subklons allenfalls additive Effekte messbar waren [151, 152, 154, 156, 159]. In epithelialen Osteosarkom-Kulturen vom Typ Saos-2 und U2OS sowie in der gemischt epithelial-fibroblastischen Zelllinie HOS waren des Weiteren Kombinationseffekte des *TRAIL*-Proteins mit Histondeacetylase-Inhibitoren, Doxorubicin oder Cisplatin sowie mit *Radiatio* nachweisbar [163, 189, 190]. Bei einer Inkubationsdauer von etwa einem Tag wurden beispielsweise für eine relevante synergistische Reduktion der Viabilität von Mammakarzinom-Zellen *TRAIL*-Konzentrationen von 25µg/mL und für Osteosarkom-Zellen Dosen von 100 ng/mL appliziert. Das Auftreten einer Chemotherapeutikavermittelten Augmentation der *TRAIL*-induzierten Zytotoxizität an Zellkultur-Modellen nicht-malignen Gewebes implizierte jedoch limitierte Tumorzellspezifität. Tomaskovic-Crook et al. wiesen des Weiteren eine epithel-mesenchymale Transition Doxorubicinbehandelter MCF-7-Zellen nach, die mit erhöhter Invasivität und Chemoresistenz einherging [114, 154, 163]. Jene Ergebnisse gaben Anlass zur Exploration von Kombinationen *DR*-agonistischer Pharmaka mit Substanzen, die bei höherer Tumorzellselektivität ein geringes Potenzial der Induktion von Dedifferenzierung und Chemoresistenz aufweisen.

Die in Abschnitt 4.2 kommentierten Daten zu proliferationsinhibitorischen Effekten einer Kombination von TRAIL und Retinoiden an in-vitro-Modellen des Mammakarzinoms und Osteosarkoms verdeutlichen mitunter, dass ein Synergismus insbesondere an Zellkulturen epithelialer Morphologie wie MCF-7, T-47D, ZR-75-1, SK-BR-3 und Saos-2 nachweisbar war, der darüber hinaus - mit Ausnahme der Zelllinie MCF-7 und im Rahmen der hier angewandten Konzentrationsbereiche – mit einer relevanten Vitalitätsminderung einherging. Bei simultaner Inkubation mit Retinoiden und einer Behandlungsdauer von 4 bis 5 Tagen waren an ZR-75-1-Zellen für eine Viabilitätsreduktion um 50-90% TRAIL-Dosen von lediglich 13-80ng/mL, an SK-BR-3-Zellen für eine Viabilitätsreduktion von 50-85% TRAIL-Dosen von lediglich 2-40ng/mL sowie an T47-D- bzw. Saos-2-Zellen für eine mindestens 50%ige Viabilitätsreduktion TRAIL-Dosen von lediglich 27 bzw. 7ng/mL erforderlich. Jene TRAIL-Konzentrationen, die für eine synergistische Inhibition des Wachstums epithelialer Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zellkulturen um mindestens 50% erforderlich waren, erwiesen sich folglich bei Kombination mit Retinoiden als deutlich geringer im Vergleich zu jenen Konzentrationen, die für entsprechende Effekte bei Kombination mit Chemotherapeutika bzw. Radiatio appliziert wurden. Ergänzend sei dennoch darauf hingewiesen, dass die in dieser Arbeit gewählte Inkubationsdauer von fünf Tagen für

die Kombination von TRAIL mit Retinoiden länger war als jene, die für die Kombination mit Chemotherapeutika bzw. Radiatio in vorgenannten Beispielen angewandt wurde. Zudem wurden atRA und 9cisRA simultan appliziert, während für Chemotherapeutika bzw. Radiatio im Vorfeld der Addition von TRAIL Präinkubationsphasen festgelegt waren [154, 163]. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass eine Kombination von atRA bzw. 9cisRA mit TRAIL insbesondere die Proliferation epithelialer Mammakarzinom- und Osteosarkom-Zelllinien inhibierte und dass das Ausmaß jener kombinierten Inhibition größer war als die Summe der jeweiligen Effekte der Einzelsubstanzen. Darüber hinaus wird angenommen, dass Retinoide an den untersuchten Zellkultur-Modellen das Ausmaß TRAIL-vermittelter zytotoxischer Effekte stärker erhöhen als oben genannte Chemotherapeutika bzw. Radiatio. Dass auch Versuchsbedingungen wie Alterationen der simultane bzw. sequenzielle Applikationsschemata oder die Länge der Inkubationsdauer jene beobachteten Unterschiede bedingt oder zumindest beeinflusst haben können, lässt sich jedoch nicht ausschließen.

5.3 Rolle von *Caspasen*, *Bcl-2*-Proteinen, Inhibitors of Apoptosis und *FLIP* im Rahmen der *TRAIL*- und Retinoid-vermittelten Signaltransduktion

In Abschnitt 2.6 wurde bereits auf das Potenzial der Retinoide, die Regulation von TRAIL-Signaltransduktionskomponenten und in diesem Zusammenhang eine Modulation der TRAIL-Responsivität von Tumorzellen zu effizieren, hingewiesen. Sun et al. und Shao et al. stellten beispielsweise fest, dass die nach Applikation des synthetischen Retinoids CD437 in Bronchialkarzinom- sowie MCF7-Mammakarzinom-Zellen induzierte Apoptose mit einer Bax-Hochregulation korrelierte [191-193]. An Prostatakarzinom-Zelllinien war jene CD437-vermittelte proapoptotische Wirkung zwar ebenfalls detektierbar, ging jedoch nicht mit einer Bax-Alteration, sondern vielmehr mit einer Aktivierung der Effektor-Caspase 3 einher [194]. Die atRA-Exposition des NB4-Zellkulturmodells der Promyelozytenleukämie resultierte hingegen sowohl in einer Expressionssteigerung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine und Inhibitors of Apoptosis als auch in einer Hochregulation des TRAIL-Proteins [5]. Sun et al. wiesen außerdem an CD437-behandelten Bronchialkarzinom-Zelllinien eine TRAIL-Steigerung der induzierten Apoptose nach, die mit einer im Vergleich zur Mono-Applikation erhöhten Prozessierung und Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie der EffektorCaspasen 3 und 7 assoziiert war [85]. Auch die synergistische Inhibition der Viabilität von Ewing-Sarkom-Zellen, die aus einer kombinierten Applikation von Fenretinid und DR-Liganden resultierte, wurde auf eine Augmentation der Caspase-8-Aktivierung zurückgeführt [135]. Cuello et al. zeigten des Weiteren, dass Fenretinid auch die TRAIL-Suszeptibilität von Ovarialkarzinom-Kulturen steigert. Als Ursache jenes Kombinationseffektes wurde auch hier eine erhöhte Aktivierung der Caspasen 8, 9, 7 und 3 festgestellt [87]. Unter Berücksichtigung jener Ergebnisse kann angenommen werden, dass Retinoide in Abhängigkeit vom Tumorzelltyp sowohl anti- als auch proapoptotische Signalwege triggern, dass jedoch für die Retinoid-induzierte Augmentation TRAIL-vermittelter zytotoxischer Effekte insbesondere die Aktivierung von Caspasen relevant ist. Entsprechend stellte sich die Frage, welche Mechanismen der synergistischen Wirkung von TRAIL und Retinoiden in Saos-2-Osteosarkom- und SK-BR-3-Mammakarzinom-Zellen zugrunde liegen.

5.3.1 Die synergistische Apoptose-Induktion in Saos-2-Zellen korrelierte mit einer Steigerung der *Caspase*-3-Aktivierung

Picarda et al. und Evdokiou et al. postulierten in ihren Veröffentlichungen bereits, dass die Effizienz TRAIL-induzierter Apoptoseprozesse in Osteosarkom-Zelllinien von der Aktivierung der Caspasen 8 und 3 abhängig ist [56, 57]. Des Weiteren konnte an Saos-2-Zellen eine Retinoid-vermittelte Hochregulation von Caspase-9-Spaltprodukten nachgewiesen werden [134]. Auf der Grundlage jener veröffentlichten Daten kann folglich eine Konvergenz TRAIL- und Retinoid-regulierter Signalwege auf Caspase-Ebene angenommen werden. Dem entsprechend ergab die Schnittmenge der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass die nach kombinierter Inkubation von Saos-2-Zellen mit 9cisRA und TRAIL beobachtete synergistische Reduktion der Zellviabilität mit einer im Vergleich zur Mono-Applikation erhöhten Caspase-3-Aktivität und Procaspase-3-Spaltung korrelierte (siehe auch Abbildung 8 und Abbildung 9). Da die Addition des pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK nicht nur eine Minderung der entsprechenden Zellviabilitäts-Reduktion, sondern auch eine Erhöhung der jeweiligen Kombinations-Indizes auf Werte über Eins bedingte, ist festzuhalten, dass sich die synergistische Zytotoxizität einer Kombination von TRAIL und 9cisRA in Saos-2-Zellen mitunter auf die Aktivierung der *Procaspase* 3 gründet (siehe auch Abbildung 10).

5.3.2 Die TRAIL- und atRA-vermittelte Apoptose-Induktion in SK-BR-3-Zellen ist Caspase-reguliert

Keane et al., Amm et al. und Singh et al. konnten bereits an Mammakarzinom-Zellen der Phänotypen T-47D, BT-474, ZR-75-1 sowie MDA-MB-231 zeigen, dass die synergistische Zytotoxizität einer Kombination agonistischer DR-Liganden Chemotherapeutika mitunter auf eine Augmentation der proteolytischen Prozessierung von Caspasen zurückführbar ist [54, 154, 159]. Überdies war offensichtlich, dass die TRAIL-vermittelte Apoptose lediglich in sensitiven Tumor-Zelllinien mit einer Caspase-Spaltung korreliert und dass jene Effekte im Falle einer TRAIL-Resistenz die Addition eines Chemotherapeutikums erfordern [160]. Keane et al. postulierten außerdem, dass insbesondere eine Addition jener Pharmaka, die per se eine Caspase-Aktivierung effizieren, eine Steigerung der proapoptotischen Wirkung von TRAIL bedingt. An o.g. invitro-Modellen des Mammakarzinoms traf dies unter anderem auf die Substanzen Doxorubicin, 5-Fluorouracil und Bortezomib zu [54, 154, 159]. Ebenfalls ergaben Untersuchungen zur kombinierten Applikation von TRAIL und Tamoxifen an MCF-7und MDA-MB-231-Zellen sowohl eine Hochregulation von Caspasen als auch eine synergistische Apoptose-Induktion [180]. Entsprechende Wirkung hatte auch die sequenzielle Anwendung von Trastuzumab und TRAIL am in-vitro-Modell vom Typ SK-BR-3 [182]. Im Rahmen dieser Arbeit war nunmehr von Interesse, ob sich der am Beispiel der SK-BR-3-Zelllinie beobachtete Kombinationseffekt womöglich ebenfalls auf eine Steigerung der Expression bzw. der Aktivierung von Caspasen gründet. Zwar ergaben Western Blot und Caspase-Activity-Assay an atRA-behandelten SK-BR-3-Kulturen eine geringfügige Augmentation der Procaspase-3- und -9-Prozessierung sowie der Caspase-8-, -9-, und -3-Aktivität, die simultane Inkubation mit TRAIL resultierte jedoch in einer allenfalls marginalen weiteren Zunahme des Ausmaßes jener Phänomene (siehe auch Abbildung 8 und Abbildung 9). Zudem resultierte die Addition des pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK zwar in einer deutlichen Diminution des Viabilitäts-reduzierenden Effektes der Kombination von TRAIL und atRA, die Konzentrations-abhängigen Kombinations-Indizes nahmen jedoch auch auf erhöhtem Viabilitäts-Niveau Werte kleiner als Eins an (siehe auch Abbildung 10). Jene Daten verdeutlichen, dass die nach simultaner Inkubation von SK-BR-3-Zellen mit TRAIL und atRA auftretende Proliferationsinhibition zwar die Aktivität von Caspasen erfordert, dass dem in diesem Zusammenhang beobachteten Synergismus jedoch auch andere Ursachen zugrunde liegen.

5.3.3 Alterationen von Bcl-2-Proteinen, Inhibitors of Apoptosis und FLIP

An in-vitro-Modellen des kolorektalen Karzinoms, des hepatozellulären Karzinoms, des malignen Melanoms, des multiplen Myeloms, des Burkitt-Lymphoms und der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie wurden bereits Zusammenhänge zwischen erhöhter FLIP-Expression und dem Malignitätsgrad sowie der Chemotherapie- und TRAIL-Resistenz maligner Neoplasien festgestellt. Weiterhin korrelierte die pharmakologische oder siRNA-vermittelte *Downregulation* jener Schlüsselkomponente der TRAIL-Signaltransduktion mit einer Sensitivierung gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose [32, 179]. An Saos-2-Zellen konnte entsprechend nachgewiesen werden, dass die Applikation des Histon-Deacetylase-Inhibitors Vorinostat bzw. die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung eine Herunterregulation der FLIP-mRNA bzw. des entsprechenden Proteins bedingte und überdies mit einer Steigerung der zytotoxischen Wirkung von TRAIL assoziiert war [163, 189]. Evdokiou et al. hingegen konnten an Osteosarkom-Zellen keine Korrelation von TRAIL-Sensitivität und FLIP-Expression feststellen [57]. Auch demonstrierten Kim et al. anhand von Western-Blot-Ergebnissen, dass die Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR-3 allenfalls geringe Mengen des FLIP-Proteins aufweist [160]. Entsprechend stellte sich die Frage, inwiefern eine eventuelle Modulation der *FLIP*-Expression für die an Saos-2und SK-BR-3-Zellen nachgewiesenen Kombinationseffekte von TRAIL und Retinoiden relevant sein kann. Die Tatsache, dass die in Abschnitt 4.9 dargestellten Western-Blot-Daten für die genannten Zelllinien weder TRAIL-, atRA- bzw. 9cisRA- noch Kombinatios-assoziierte Alterationen des FLIP-Proteins zeigen, legt jedoch nahe, dass jener Signaltransduktionskomponente im o.g. Zusammenhang keine zentrale Rolle zugeordnet werden kann.

In einer Übersichtsarbeit zu Mechanismen der *TRAIL*-Resistenz verschiedener in-vitro-Modelle postulierten Zhang et al. bereits, dass die Relevanz von Proteinen der *Bcl-2*-Familie für die *TRAIL*-vermittelte Zytotoxizität mitunter Zelltyp-abhängig ist. Entsprechend wurde darauf hingewiesen, dass ein Doppel-Knockout der proapoptotischen *Bcl-2*-Proteine *Bax* und *Bak* an murinen embryonalen Fibroblasten die *TRAIL*-induzierte Cytochrom-C-Freisetzung inhibierte [32]. Des Weiteren korrelierte auch die Expression des antiapoptotischen Vertreters *Mcl-1* mit einer Resistenz von Tumorzellen gegenüber *TRAIL*, die sich zudem infolge eines *Mcl-1*-Knockdowns rückläufig zeigte [179]. Zhang und Zhang konnten hingegen an den Mammakarzinom-

Zelllinien MCF-7, T-47D, SK-BR-3, BT-474, MDA-MB-231 und -468 keinerlei direkte Relation zwischen TRAIL-Responsivität und dem Ausmaß der Expression diverser Bcl-2-Proteine feststellen [158]. Demgegenüber zeigten Amm et al., dass die nach simultaner Applikation eines DR-agonistischen Antikörpers mit Doxorubicin bzw. Bortezomib beobachtete synergistische Zytotoxizität in BT-474- und T-47D-Zellen mit einer Downregulation pro- und einer Hochregulation antiapoptotischer Bcl-2-Proteine einherging [159]. An in-vitro-Modellen des Osteosarkoms vom Typ Saos-2 und HOS, an denen die Anwendung von TRAIL in Kombination mit ionisierender Strahlung eine synergistische Apoptose-Induktion bedingte, war keine Alteration von Bax und Bcl-2 nachzuweisen [163]. Die gegenwärtige Datenlage erlaubt folglich keine generelle Aussage zur Rolle der Bcl-2-Proteine im Rahmen der TRAIL-vermittelten Zytotoxizität. Retinoide fungieren mitunter als Regulatoren diverser Vertreter jener Substanzklasse. An MCF-7- sowie an Saos-2-Zellen wurde in diesem Zusammenhang sowohl eine Downregulation von Bcl-2 als auch eine Hochregulation von Bax festgestellt [134, 193]. Einer der Themenschwerpunkte dieser Arbeit umfasste entsprechend die Untersuchung des Einflusses von atRA bzw. 9cisRA auf die Expression von Bcl-2-Proteinen in SK-BR-3- bzw. Saos-2-Zellen sowie ggf. die Exploration seiner Relevanz für die *TRAIL*-vermittelte Zytotoxizität.

Aus der an SK-BR-3-Zellen beobachteten *Downregulation* von *Mcl-1* nach Behandlung mit TRAIL, der *Downregulation* von *Bcl-2* und Hochregulation von *Bak* nach Behandlung mit *atRA* sowie der sowohl *TRAIL-* als auch *atRA-*vermittelten Steigerung der *tBid-*Quantitäten lässt sich schlussfolgern, dass Proteine der *Bcl-2-*Familie im Rahmen der bisher gezeigten antiproliferativen bzw. proapoptotischen Wirkungen von *TRAIL* und Retinoiden zentrale regulatorische Funktionen übernehmen. Diesbezüglich kann angenommen werden, dass die an SK-BR-3-Kulturen beobachtete *Caspase-*Prozessierung und -Aktivierung sowohl über extrinsiche – also *DR-*vermittelte – als auch über intrinsische – also durch Desintegration der Mitochondrien initiierte - Mechanismen erfolgen kann. Die Spaltung von *Bid* zu *tBid*, die eine Amplifikation *TRAIL-*induzierter zytotoxischer Effekte über jenen mitochondrialen Apoptose-Weg bedingt, stellt hierbei die Schnittstelle zwischen jener extrinsischen und intrinsichen proapoptotischen Signaltransduktion dar (siehe auch Abschnitt 2.3.2).

An Saos-2-Zellen hingegen ließen sich weder *TRAIL*- bzw. Retinoid-, noch Kombinations-assoziierte Alterationen der *Bcl-2*-Proteine *Mcl-1* und *Bak* nachweisen (siehe auch Abbildung 12 A). Ob jenes in-vitro-Modell im Hinblick auf die *DR*-vermittelte Apoptose-Induktion in die Kategorie der Typ-I-Zellen einzuordnen wäre, kann anhand der hier erhobenen Daten lediglich vermutet werden. Eine diesbezügliche Aussage erfordert mitunter die Untersuchung *TRAIL*- und Retinoid-vermittelter Alterationen weiterer Vertreter jener Proteinkategorie.

Proteine der Inhibitors-of-Apoptosis-Familie fungieren als Inhibitoren der katalytischen Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 sowie der Procaspase-9-Prozessierung, sodass das Ausmaß ihrer Expression in Tumorzellen positiv mit dem Grad der Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose korreliert [32]. An Aderhautmelanom-Zelllinien konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass geringe Quantitäten des Survivin-Proteins mit hoher TRAIL-Sensitivität und verhältnismäßig hohe Survivin-Expression mit TRAIL-Resistenz korrelierten. Überdies resultierte die pharmakologisch oder siRNAvermittelte Downregulation von Survivin und/oder XIAP am in-vitro-Modell des Melanoms, des Nierenzellkarzinoms sowie des Mammakarzinoms mit einer Steigerung der TRAIL-Responsivität [179]. Oliver et al. stellten anhand von Untersuchungen der Suszeptibilität von Mammakarzinom-Zellkulturen gegenüber einem *DR*5-agonistischen Antikörper fest, dass ein Großteil der resistenten, nicht triple-negativen Zelllinien hohe Quantitäten des cIAP1-Proteins aufwies, dass zwei moderat responsive HER2amplifizierende Zelllinien jenes Protein in geringerem Ausmaß exprimierten und dass die Mehrheit der TRAIL-sensitiven triple-negativen Zelllinien eine sehr niedrige bis kaum detektierbare cIAP1-Expression zeigte [156]. Eine aus der Addition von Doxorubicin oder Bortezomib resultierende Sensitivierung initial refraktärer BT-474- und T-47D-Zellen gegenüber jenem Antikörper war des Weiteren mit einer Downregulation von XIAP assoziiert [159]. Auch an Osteosarkom-Zelllinien ging sowohl die durch ionisierende Strahlung als auch die Zytostatika-vermittelte Augmentation der TRAILinduzierten Zytotoxizität mit einer Repression von XIAP einher [163, 190]. Pratt et al. demonstrierten außerdem an MCF-7- und ZR-75-1-Kulturen eine atRA- bzw. 9cis-RAvermittelte Downregulation von Survivin, die zudem mit einer Sensitivierung gegenüber Taxol-induzierter Proliferationsinhibition korrelierte [79]. Jene Datenlage verdeutlicht einerseits, dass Retinoide als potenzielle Regulatoren der IAPs fungieren und zeigt andererseits, dass eine Downregulation diverser Vertreter jener Proteinfamilie eine

Steigerung der Sensitivität gegenüber *TRAIL*- und Chemotherapie-vermittelter Zytotoxizität bedingen kann. Die in Abschnitt 4.9 dargestellten Ergebnisse dienten der Exploration einer *atRA*- bzw. *9cisRA*-vermittelten Modulation von IAPs an SK-BR-3-bzw. Saos-2-Zellen sowie der Untersuchung ihres Einfluss auf die *TRAIL*-induzierte Proliferationsinhibition. Den oben erwähnten Ergebnissen von Pratt et al. entsprechend zeigten *TRAIL*-behandelte SK-BR-3-Zellen eine *Downregulation* von *Survivin*. Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich jedoch eine Exposition gegenüber *atRA* in Bezug auf die Reduktion der Quantitäten jenes Proteins als effektiver (siehe auch Abbildung 12 B). Expressions-Alterationen von *cIAP1* (siehe auch Abbildung 12 A) und *XIAP* (Daten nicht gezeigt) waren hingegen nicht offensichtlich. Weiterhin waren auch an Saos-2-Zellen keinerlei Behandlungs-abhängige Änderungen der Expression von *Survivin*, *cIAP1* und *XIAP* detektierbar (Daten nicht gezeigt). Oben genannte Daten gewähren folglich die Hypothese, dass an der *atRA*-bedingten Steigerung der *TRAIL*-induzierten Viabilitäts-Reduktion von SK-BR-3-Zellen mitunter eine *Downregulation* von *Survivin* beteiligt ist.

5.4 Rolle der *Death Receptors* im der Rahmen *TRAIL*- und Retinoidvermittelten Signaltransduktion

Trotzdem weder an Mammakarzinom- noch an Osteosarkom-Zellen das Ausmaß der Expression von DR4 und DR5 mit deren Suszeptibilität gegenüber TRAIL-vermittelter Zytotoxizität korreliert, konnte gezeigt werden, dass eine Exposition gegenüber Chemotherapeutika sowie ionisierender Strahlung die Hochregulation jener Rezeptoren und folglich eine TRAIL-Sensitivierung bedingen kann [19, 32, 39, 54, 158, 179]. Zudem war an Zellkulturmodellen diverser Tumorentitäten offensichtlich, dass die TRAILinduzierte Apoptose je nach Phänotyp vorrangig entweder DR4- oder DR5-vermittelt abläuft [179]. Rahman et al. demonstrierten hierzu, dass jene Prozesse in Mammakarzinom-Zelllinien vorrangig die Expression von DR5 erfordern [39]. Einer der Interessenschwerpunkte dieser Arbeit umfasste die Exploration Retinoid-vermittelter Alterationen der DRs am Beispiel der in-vitro-Modelle SK-BR-3 und Saos-2 sowie die Erfassung ihrer Funktion im Rahmen der TRAIL-induzierten Proliferationsinhibition. Experimentelle Studien an Zelllinien des nichtkleinzelligen Bronchial-, Prostatakarzinoms sowie des Ewing-Sarkoms zeigten bereits, dass die kombinierte Exposition jener Tumorzellkulturen gegenüber DR-Agonisten und Retinoiden eine synergistische Apoptose-Induktion bedingte, die mitunter auf eine Hochregulation von DRs zurückgeführt wurde [85, 135, 194].

Die in Abbildung 11 dargestellten *Western-Blot*-Ergebnisse verdeutlichen, dass auch an SK-BR-3-Zellen eine Kombination von *TRAIL* und *atRA* mit einer deutlichen Augmentation der *DR*5-Expression korrelierte, während die Mono-Applikation von *TRAIL* allenfalls marginale und *atRA* allein keinerlei diesbezügliche Alterationen bedingte. In Saos-2-Zellen hingegen ließen sich keine Behandlungs-abhängigen quantitativen Änderungen des *DR*5-Proteins nachweisen. Demnach ist festzuhalten, dass der *TRAIL*-und Retinoid-induzierten synergistischen Zytotoxizität am SK-BR-3-Modell mitunter eine Hochregulation von *DR*5 zugrunde liegt, während entsprechende Beobachtungen an Saos-2-Kulturen die Konsequenz anderer Mechanismen darstellen.

Auch Pan et al. demonstrierten an MCF-7-Zellen die Relevanz des *DR*5 für die *TRAIL*-vermittelte Viabilitätsinhibition mittels Nachweis einer Induktion von Apoptose als Folge einer *DR*5-Überexpression. Jener Effekt ließ sich zudem durch Addition eines *Caspase*-Inhibitors aufheben [195]. Des Weiteren bedingte die siRNA-vermittelte Ausschaltung des *DR*5 in *TRAIL*-sensitiven Mammakarzinom-Zelllinien eine Inhibition der *TRAIL*-induzierten Zytotoxizität, während entsprechende Wirkungen eines *DR*4-knockdowns in allenfalls geringem Ausmaß auftraten [39, 53].

Demgegenüber stellten Kazdhan et al. fest, dass auch *DR*4-Alterationen Einfluss auf die Viabilität entsprechender in-vitro-Modelle nehmen. So bedingte die Überexpression jenes Rezeptors in fünf von sechs Mammakarzinom-Zelllinien eine Viabilitätsreduktion auf weniger als 5%. Zwar ergaben *Western-Blot*-Analysen der Gesamt-Zell-Proteinlysate von SK-BR-3-Kulturen keinerlei Zusammenhang zwischen *DR*4-Expression und *TRAIL*- bzw. *atRA*-vermittelter Zytotoxizität (siehe auch Abbildung 11). Liu et al. wiesen dennoch eine *atRA*-vermittelte Hochregulation sowohl der *DR*4-mRNA als auch der Expression des *DR*4-Proteins auf der Zytoplasma-Membran-Oberfläche von MCF-7-, T47D- und SK-BR-3-Zellen nach, die sich durch Addition von *TRAIL* weiter steigern ließ. Darüber hinaus korrelierte ein Knockdown jenes Rezeptors mit einer Reduktion der *atRA*-induzierten *Caspase*-3-Prozessierung [Daten aktuell noch nicht veröffentlicht].

Den gezeigten Western-Blot-Ergebnissen sowie der oben geschilderten Datenlage kann demnach entnommen werden, dass die Augmentation sowohl der DR4- als auch der DR5-Expression an der TRAIL- und atRA-vermittelten Inhibition der Vitalität von Mammakarzinom-Zellen beteiligt sein kann.

Wie Abbildung 11 weiterhin zeigt, korrelierte die Mono-Applikation von *TRAIL* und *9cisRA* an Saos-2-Kulturen mit einer jeweils diskreten Hochregulation jenes Rezeptors. Für dieses Osteosarkom-Modell wird demnach eine eventuelle Relevanz des *DR*4 für dessen Responsivität gegenüber einer Kombination von *TRAIL* und *9cisRA* angenommen.

5.5 Tumorselektivität der TRAIL- und Retinoid-induzierten Apoptose

Da DR4 und DR5 in Neoplasien diverser Entitäten exprimiert werden und maligne im Vergleich zu nicht-transformierten Zellverbänden zumeist suszeptibler auf deren Stimulation reagieren, stellen jene Rezeptoren exzellente Angriffspunkte für potenziell antikanzerogene Wirkstoffe wie TRAIL und DR-agonistische Antikörper dar [19]. Armeanu et al. zeigten jedoch, dass die Adenovirus-vermittelte Transduktion des TRAIL-Gens nicht nur an in-vitro-Modellen des hepatozellulären Karzinoms, sondern auch in primären humanen Hepatozyten zur Induktion von Apoptose führte [196]. Des Weiteren wurde auch an weiteren nicht-transformierten Säugetierzellen nachgewiesen, dass die Hochregulation von DR4 bzw. DR5 eine Sensitivierung gegenüber DRagonistischen Pharmaka bzw. eine Liganden-abhängige Apoptose-Induktion bedingen kann [32, 195]. Darüber hinaus stellten Keane et al. fest, dass die TRAIL-Mono-Applikation in einer von acht und die Kombination von TRAIL und Doxorubicin bzw. 5-Fluorouracil in jeweils vier von vier nicht-malignen mammären Zelllinien mit einer signifikanten Zytotoxizität korrelierte [154]. Auch Evdokiou et al. wiesen zytostatische bzw. zytotoxische Effekte einer Langzeit-Inkubation primärer Knochenzellen mit TRAIL und Cisplatin, Etoposid bzw. Doxorubicin nach [57]. Dass eine Kombination von TRAIL mit Agentien, die über gezieltere Mechanismen antikanzerogene Wirkungen entfalten, tumorzellspezifischere Toxizität zeigt, konnte am Beispiel des selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulators Tamoxifen demonstriert werden, dessen Addition keinen Effekt auf die Viabilität benigner mammärer Epithelzellen hatte [180]. Obgleich des Weiteren die simultane Applikation von TRAIL und dem synthetischen Retinoid CD437 am invitro-Modell des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit einer Induktion von Apoptose-Prozessen korrelierte, trat jenes Phänomen an gemeinen pulmonalen Epithelzellen nicht auf [85]. Entsprechend demonstrierten White et al., dass die Exposition der Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-32 gegenüber TRAIL und 4HPR (Fenretinid) zwar eine synergistische Zytotoxizität bedingte, an nicht-malignen Epithel- bzw. mesenchymalen Stammzellen hingegen keinerlei Alteration der Viabilität effizierte [135].

Die Erhebung der in Abschnitt 4.10 erläuterten Daten diente der Untersuchung des zytotoxischen Potenzials von TRAIL, atRA bzw. 9cisRA sowie deren Kombination an mammären Epithelzellen vom Typ MCF10A und primären Osteoblasten. MCF10A-Zellen, die sich als gering responsiv gegenüber TRAIL und resistent gegenüber atRA erwiesen, zeigten nach kombinierter Inkubation selbst bei Konzentrationen, die der vierfachen Höhe der an SK-BR-3-Zellen applizierten Maximaldosen entsprachen, eine Viabilitäts-Reduktion um lediglich 30% (siehe auch Abbildung 13 A). An primären Osteoblasten, die sich hingegen TRAIL-resistent und geringfügig suszeptibel gegenüber 9cisRA verhielten, korrelierte die simultane Applikation von TRAIL in doppelter und 9cisRA in vierfacher der entsprechend an Saos-2-Kulturen maximal angewandten Konzentration mit einer Reduktion der Zellviabilität um allenfalls 20% (siehe auch Abbildung 13 B). Verglichen mit der am Tumorzell-Modell gemessenen maximalen Proliferationsinhibition, die für SK-BR-3-Zellen 77% und für Saos-2-Zellen 55% betrug (siehe auch Abbildung 3 A und D), kann folglich die Suszeptibilität nicht-transformierter in-vitro-Modelle entsprechender Gewebs-Entitäten als gering eingeschätzt werden. Demnach resultiert anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten und unter Berücksichtigung der oben genannten Forschungsergebnisse die Annahme, dass die Zytotoxizität einer Kombination von TRAIL und Retinoiden vorrangig Tumorzellen und in allenfalls geringem Ausmaß nicht-malignes Gewebe betrifft. Folglich kann auch die klinische Anwendbarkeit jenes Therapie-Entwurfs als tumorzellspezifische Alternative zur aktuellen Pharmakotherapie des Mammakarzinoms sowie des Osteosarkoms diskutiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
- 2. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
- 3. Hannun, Y.A., *Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy.* Blood, 1997. **89**(6): p. 1845-53.
- 4. Shankar, S. and R.K. Srivastava, *Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications.* Drug Resist Updat, 2004. **7**(2): p. 139-56.
- 5. Altucci, L., et al., Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 680-6.
- 6. Noy, N., Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. Annu Rev Nutr, 2010. **30**: p. 201-17.
- 7. Altucci, L. and H. Gronemeyer, *The promise of retinoids to fight against cancer.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 181-93.
- 8. *Krebs in Deutschland 2007/2008* 2012, Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- 9. Sterbefälle weiblich 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10. 2013; Available from:

 https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleWeiblich.html.
- 10. Kreienberg, R., et al., Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2008: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Industriestraße 1, D-82110 Germering/München.
- 11. Eucker, J., Habilitationsschrift: Optimierung der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms unter besonderer Berücksichtigung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs, 2013: Berlin. p. 6.
- 12. Gonzalez-Angulo, A.M., F. Morales-Vasquez, and G.N. Hortobagyi, *Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer.* Adv Exp Med Biol, 2007. **608**: p. 1-22.
- 13. Brenton, J.D., et al., *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7350-60.
- 14. Bielack, S. *Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie Osteosarkome*. 2010; Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0051_S1_Osteosarkome_2011-04_01.pdf.
- 15. Gorlick, R., et al., *Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma.* J Clin Oncol, 1999. **17**(9): p. 2781-8.
- 16. Ebb, D., et al., Phase II trial of trastuzumab in combination with cytotoxic chemotherapy for treatment of metastatic osteosarcoma with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol, 2012. **30**(20): p. 2545-51.
- 17. Hong, S.H., et al., *Differentiation induction of canine osteosarcoma cell lines by retinoids*. Res Vet Sci, 2000. **68**(1): p. 57-62.
- 18. Kimberley, F.C. and G.R. Screaton, *Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors.* Cell Res, 2004. **14**(5): p. 359-72.
- 19. Ashkenazi, A., *Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists.* Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(12): p. 1001-12.
- 20. Monleon, I., et al., Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6736-44.

- 21. Thorburn, A., K. Behbakht, and H. Ford, *TRAIL receptor-targeted therapeutics:* resistance mechanisms and strategies to avoid them. Drug Resist Updat, 2008. **11**(1-2): p. 17-24.
- 22. Cretney, E., et al., *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice.* J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1356-61.
- 23. Grosse-Wilde, A., et al., *TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development.* J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 100-10.
- 24. Finnberg, N., A.J. Klein-Szanto, and W.S. El-Deiry, *TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis.* J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 111-23.
- 25. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice.* Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 255-60.
- 26. Sedger, L.M., et al., Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2246-54.
- 27. Clancy, L., et al., *Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18099-104.
- 28. Mahalingam, D., et al., *TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?* Cancer Treat Rev. 2009. **35**(3): p. 280-8.
- 29. Suliman, A., et al., *Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways.* Oncogene, 2001. **20**(17): p. 2122-33.
- 30. Wang, S., The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. Oncogene, 2008. **27**(48): p. 6207-15.
- 31. Newsom-Davis, T., S. Prieske, and H. Walczak, *Is TRAIL the holy grail of cancer therapy?* Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 607-23.
- 32. Zhang, L. and B. Fang, *Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer.* Cancer Gene Ther, 2005. **12**(3): p. 228-37.
- 33. Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. Nature, 2000. 407(6805): p. 770-6.
- 34. Daniel, P.T., et al., *The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy.* Leukemia, 2001. **15**(7): p. 1022-32.
- 35. Abdulghani, J. and W.S. El-Deiry, *TRAIL receptor signaling and therapeutics*. Expert Opin Ther Targets, 2010. **14**(10): p. 1091-108.
- 36. Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie, *Defying death after DNA damage*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 777-83.
- 37. Elrod, H.A. and S.Y. Sun, *Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents.* Cancer Biol Ther, 2008. **7**(2): p. 163-73.
- 38. Aggarwal, B.B., U. Bhardwaj, and Y. Takada, *Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors.* Vitam Horm, 2004. **67**: p. 453-83.
- 39. Rahman, M., et al., *TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype.* Breast Cancer Res Treat, 2009. **113**(2): p. 217-30.
- 40. Elias, A., et al., *Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5457-65.
- 41. Bae, S.I., et al., Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. Oncogene, 2008. **27**(4): p. 490-8.
- 42. Aguilera, D.G., et al., Reactivation of death receptor 4 (DR4) expression sensitizes medulloblastoma cell lines to TRAIL. J Neurooncol, 2009. **93**(3): p. 303-18.
- 43. Fulda, S., et al., Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by reexpression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. Oncogene, 2001. **20**(41): p. 5865-77.
- 44. Yeh, W.C., et al., Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. Immunity, 2000. **12**(6): p. 633-42.

- 45. Hunter, A.M., E.C. LaCasse, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets*. Apoptosis, 2007. **12**(9): p. 1543-68.
- 46. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.* EMBO J, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
- 47. Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, and R. Takahashi, *Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8662-7.
- 48. Li, F., et al., Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature, 1998. **396**(6711): p. 580-4.
- 49. Tamm, I., et al., *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.* Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5315-20.
- 50. Marusawa, H., et al., *HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression.* EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2729-40.
- 51. LeBlanc, H., et al., *Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax.* Nat Med, 2002. **8**(3): p. 274-81.
- 52. Sun, S.Y., Chemopreventive agent-induced modulation of death receptors. Apoptosis, 2005. **10**(6): p. 1203-10.
- 53. Rahman, M., J.G. Pumphrey, and S. Lipkowitz, *The TRAIL to targeted therapy of breast cancer.* Adv Cancer Res, 2009. **103**: p. 43-73.
- 54. Singh, T.R., et al., Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5390-400.
- 55. Finn, R.S., et al., Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. Breast Cancer Res Treat, 2007. **105**(3): p. 319-26.
- 56. Picarda, G., et al., *Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(8): p. 2363-74.
- 57. Evdokiou, A., et al., Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. Int J Cancer, 2002. **99**(4): p. 491-504.
- 58. Ashkenazi, A., P. Holland, and S.G. Eckhardt, *Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)*. J Clin Oncol, 2008. **26**(21): p. 3621-30.
- 59. McCarthy, M.M., et al., *Evaluating the expression and prognostic value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in breast cancer.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5188-94.
- 60. Ganten, T.M., et al., *Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer.* J Mol Med (Berl), 2009. **87**(10): p. 995-1007.
- 61. Sanlioglu, A.D., et al., *TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(3): p. 716-23.
- 62. Forero-Torres, A., et al., *Phase I trial of weekly tigatuzumab, an agonistic humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5 (DR5).* Cancer Biother Radiopharm, 2010. **25**(1): p. 13-9.
- 63. Sharma, S., et al., Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the DR5 antibody LBY135 alone and in combination with capecitabine in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs, 2013.
- 64. Plummer, R., et al., *Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(20): p. 6187-94.

- 65. Merchant, M.S., et al., *Phase I trial and pharmacokinetic study of lexatumumab in pediatric patients with solid tumors*. J Clin Oncol, 2012. **30**(33): p. 4141-7.
- 66. Pan, Y., et al., Evaluation of pharmacodynamic biomarkers in a Phase 1a trial of dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in patients with advanced tumours. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1830-8.
- 67. Herbst, R.S., et al., *Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(17): p. 2839-46.
- 68. Tolcher, A.W., et al., *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.* J Clin Oncol, 2007. **25**(11): p. 1390-5.
- 69. Poulain, S., et al., *Vitamin A/retinoids signalling in the human lung.* Lung Cancer, 2009. **66**(1): p. 1-7.
- 70. Liu, Y., et al., Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1138-49.
- 71. Michalik, L. and W. Wahli, *Guiding ligands to nuclear receptors*. Cell, 2007. **129**(4): p. 649-51.
- 72. Lexikon der Biochemie. Vol. 1. 1999/2000, Heidelberg: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
- 73. Löffler G., P.P.E., *Biochemie & Pathobiochemie*. Vol. 7. 2003, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- 74. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily.* Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 950-64.
- 75. Bastien, J. and C. Rochette-Egly, *Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes*. Gene, 2004. **328**: p. 1-16.
- 76. Lin, Y.D., et al., CAAT/enhancer binding protein homologous protein-dependent death receptor 5 induction is a major component of SHetA2-induced apoptosis in lung cancer cells. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5335-44.
- 77. Altucci, L., et al., *RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease.* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(10): p. 793-810.
- 78. Liu, M., A. lavarone, and L.P. Freedman, *Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation.* J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31723-8.
- 79. Pratt, M.A., M. Niu, and D. White, *Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids.* J Cell Biochem, 2003. **90**(4): p. 692-708.
- 80. Fanjul, A., et al., *A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation.* Nature, 1994. **372**(6501): p. 107-11.
- 81. Resche-Rigon, M. and H. Gronemeyer, *Therapeutic potential of selective modulators of nuclear receptor action.* Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(4): p. 501-7.
- 82. Chen, J.Y., et al., RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. EMBO J, 1995. **14**(6): p. 1187-97.
- 83. Lin, F., et al., *Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta.* Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3271-80.
- 84. Engedal, N., P. Auberger, and H.K. Blomhoff, Retinoic acid regulates Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells: reversal of mitogen-mediated repression of Fas DISC assembly. J Leukoc Biol, 2009. **85**(3): p. 469-80.
- 85. Sun, S.Y., et al., Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7149-55.

- 86. Clarke, N., et al., *Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL.* EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3051-60.
- 87. Cuello, M., et al., *N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4HPR) enhances TRAIL-mediated apoptosis through enhancement of a mitochondrial-dependent amplification loop in ovarian cancer cell lines.* Cell Death Differ, 2004. **11**(5): p. 527-41.
- 88. Liu, T., et al., Flex-Hets differentially induce apoptosis in cancer over normal cells by directly targeting mitochondria. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(6): p. 1814-22.
- 89. Sheikh, M.S., et al., Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor-alpha acquire sensitivity to growth inhibition by retinoids. J Biol Chem, 1994. **269**(34): p. 21440-7.
- 90. Wu, Q., et al., *Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6598-608.
- 91. Koay, D.C., et al., Anti-tumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations. Breast Cancer Res, 2010. **12**(4): p. R62.
- 92. Costa, A., Breast cancer chemoprevention. Eur J Cancer, 1993. **29A**(4): p. 589-92.
- 93. Hansen, L.A., et al., *Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy.* Carcinogenesis, 2000. **21**(7): p. 1271-9.
- 94. Fitzgerald, P., et al., Retinoic acid receptor alpha expression correlates with retinoid-induced growth inhibition of human breast cancer cells regardless of estrogen receptor status. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2642-50.
- 95. Schneider, S.M., et al., Activation of retinoic acid receptor alpha is sufficient for full induction of retinoid responses in SK-BR-3 and T47D human breast cancer cells. Cancer Res, 2000. **60**(19): p. 5479-87.
- 96. Butler, W.B. and J.A. Fontana, Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7. Cancer Res, 1992. **52**(22): p. 6164-7.
- 97. Rubin, M., et al., 9-Cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down-regulates estrogen receptor RNA and protein. Cancer Res, 1994. **54**(24): p. 6549-56.
- 98. Salvatori, L., et al., *Action of retinoic acid receptor on EGFR gene transactivation and breast cancer cell proliferation: Interplay with the estrogen receptor.* Biomed Pharmacother, 2011. **65**(4): p. 307-12.
- 99. Hua, S., R. Kittler, and K.P. White, *Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer.* Cell, 2009. **137**(7): p. 1259-71.
- 100. Alsafadi, S., et al., *Retinoic acid receptor alpha amplifications and retinoic acid sensitivity in breast cancers.* Clin Breast Cancer, 2013. **13**(5): p. 401-8.
- 101. Grunt Th, W., et al., Effects of retinoic acid and fenretinide on the c-erbB-2 expression, growth and cisplatin sensitivity of breast cancer cells. Br J Cancer, 1998. **78**(1): p. 79-87.
- 102. Haydon, R.C., et al., *Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1288-94.
- 103. Wagner, E.R., et al., *Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 325238.
- 104. Barroga, E.F., et al., Effects of vitamin D and retinoids on the differentiation and growth in vitro of canine osteosarcoma and its clonal cell lines. Res Vet Sci, 1999. **66**(3): p. 231-6.
- 105. Hong, W.K. and M.B. Sporn, *Recent advances in chemoprevention of cancer.* Science, 1997. **278**(5340): p. 1073-7.
- 106. Veronesi, U., et al., Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer. Ann Oncol, 2006. **17**(7): p. 1065-71.
- 107. Veronesi, U., et al., Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(21): p. 1847-56.
- 108. Rao, R.D., et al., Phase III double-blind, placebo-controlled, prospective randomized trial of adjuvant tamoxifen vs. tamoxifen and fenretinide in postmenopausal women with

- positive receptors (EB193): an intergroup trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. Med Oncol, 2011. **28 Suppl 1**: p. S39-47.
- 109. Cobleigh, M.A., et al., *Phase I/II trial of tamoxifen with or without fenretinide, an analog of vitamin A, in women with metastatic breast cancer.* J Clin Oncol, 1993. **11**(3): p. 474-7.
- 110. Sutton, L.M., et al., *Pharmacokinetics and clinical impact of all-trans retinoic acid in metastatic breast cancer: a phase II trial.* Cancer Chemother Pharmacol, 1997. **40**(4): p. 335-41.
- 111. Budd, G.T., et al., *Phase I/II trial of all-trans retinoic acid and tamoxifen in patients with advanced breast cancer.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(3): p. 635-42.
- 112. Kurie, J.M., et al., *Phase I trial of 9-cis retinoic acid in adults with solid tumors.* Clin Cancer Res, 1996. **2**(2): p. 287-93.
- 113. Lawrence, J.A., et al., *Phase I clinical trial of alitretinoin and tamoxifen in breast cancer patients: toxicity, pharmacokinetic, and biomarker evaluations.* J Clin Oncol, 2001. **19**(10): p. 2754-63.
- 114. Tomaskovic-Crook, E., E.W. Thompson, and J.P. Thiery, *Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(6): p. 213.
- 115. Choi, Y., et al., *Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer.* Hum Pathol, 2013. **44**(11): p. 2581-9.
- 116. Yang, K.M., et al., Loss of TBK1 induces epithelial-mesenchymal transition in the breast cancer cells by ERalpha downregulation. Cancer Res, 2013. **73**(22): p. 6679-89.
- 117. Mallini, P., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition: What is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance.* Cancer Treat Rev, 2013.
- 118. Widschwendter, M., et al., Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4158-61.
- 119. Xu, X.C., et al., *Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis.* Cancer Res, 1997. **57**(22): p. 4992-6.
- 120. Graham, M.L., 2nd, et al., *T47DCO cells, genetically unstable and containing estrogen receptor mutations, are a model for the progression of breast cancers to hormone resistance*. Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6208-17.
- 121. Massarweh, S. and R. Schiff, Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. Endocr Relat Cancer, 2006. **13 Suppl 1**: p. S15-24.
- 122. Smith, M.A., et al., *Phase I and pharmacokinetic evaluation of all-trans-retinoic acid in pediatric patients with cancer.* J Clin Oncol, 1992. **10**(11): p. 1666-73.
- 123. Adamson, P.C., et al., Phase I trial and pharmacokinetic study of all-trans-retinoic acid administered on an intermittent schedule in combination with interferon-alpha2a in pediatric patients with refractory cancer. J Clin Oncol, 1997. **15**(11): p. 3330-7.
- 124. Adamson, P.C., et al., A phase I trial and pharmacokinetic study of 9-cis-retinoic acid (ALRT1057) in pediatric patients with refractory cancer: a joint Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute, and Children's Cancer Group study. Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3034-9.
- 125. Villablanca, J.G., et al., *Phase I trial of oral fenretinide in children with high-risk solid tumors: a report from the Children's Oncology Group (CCG 09709).* J Clin Oncol, 2006. **24**(21): p. 3423-30.
- 126. Ozkan, A., et al., All-Trans Retinoic Acid , Interferon-α and Zoledronic Acid (Zometa ®) in the Treatment of a Patient with Resistant Metastatic Osteosarcoma. Austral Asian Journal of Cancer, 2006. **5**(4).
- 127. Todesco, A., et al., *All-trans retinoic acid and interferon-alpha in the treatment of a patient with resistant metastatic osteosarcoma*. Cancer, 2000. **89**(12): p. 2661-6.
- 128. Wehling, M., et al., Klinische Pharmakologie. Vol. 2. 2011, Stuttgart: Thieme.
- 129. Whelan, J., B. Seddon, and M. Perisoglou, *Management of osteosarcoma*. Curr Treat Options Oncol, 2006. **7**(6): p. 444-55.

- 130. Gorlick, R., et al., *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: bone tumors.* Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(6): p. 1009-15.
- 131. Rainusso, N., L.L. Wang, and J.T. Yustein, *The adolescent and young adult with cancer:* state of the art -- bone tumors. Curr Oncol Rep, 2013. **15**(4): p. 296-307.
- 132. Ferguson, W.S. and A.M. Goorin, *Current treatment of osteosarcoma*. Cancer Invest, 2001. **19**(3): p. 292-315.
- 133. Bacci, G., et al., Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. Ann Oncol, 2003. **14**(7): p. 1126-34.
- 134. Dozza, B., et al., Cell growth inhibition and apoptotic effect of the rexinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene on human osteosarcoma and mesenchymal stem cells. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(1): p. 142-9.
- 135. White, D.E. and S.A. Burchill, Fenretinide-dependent upregulation of death receptors through ASK1 and p38alpha enhances death receptor ligand-induced cell death in Ewing's sarcoma family of tumours. Br J Cancer, 2010. **103**(9): p. 1380-90.
- 136. Jin, F., et al., Activation of nuclear factor-kappaB contributes to induction of death receptors and apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in DU145 human prostate cancer cells. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6354-63.
- 137. He, B.C., et al., Synergistic antitumor effect of the activated PPARgamma and retinoid receptors on human osteosarcoma. Clin Cancer Res, 2010. **16**(8): p. 2235-45.
- 138. Zhang, D., et al., *Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(11): p. 1686-96.
- 139. Luo, X.M. and A.C. Ross, *Retinoic acid exerts dual regulatory actions on the expression and nuclear localization of interferon regulatory factor-1.* Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(5): p. 619-31.
- 140. Sarrio, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 989-97.
- 141. Zhao, Z., et al., Effect of 9-cis-retinoic acid on growth and RXR expression in human breast cancer cells. Exp Cell Res, 1995. **219**(2): p. 555-61.
- 142. van der Burg, B., et al., *Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function.* Mol Cell Endocrinol, 1993. **91**(1-2): p. 149-57.
- 143. Roman, S.D., et al., *Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells.* Cancer Res, 1992. **52**(8): p. 2236-42.
- 144. van der Leede, B.M., C.E. van den Brink, and P.T. van der Saag, *Retinoic acid receptor and retinoid X receptor expression in retinoic acid-resistant human tumor cell lines.* Mol Carcinog, 1993. **8**(2): p. 112-22.
- 145. Scotlandi, K., et al., *Prognostic and therapeutic relevance of HER2 expression in osteosarcoma and Ewing's sarcoma.* Eur J Cancer, 2005. **41**(9): p. 1349-61.
- 146. Langdon, S.P., Cancer Cell Culture: Methods and Protocols / edited by Simon P. Langdon. Vol. 88. 2004, Totowa, New Jersey: Humana Press.
- 147. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.* Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
- 148. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method.* Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 440-6.
- 149. Francis, P., et al., Adjuvant chemotherapy with sequential or concurrent anthracycline and docetaxel: Breast International Group 02-98 randomized trial. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(2): p. 121-33.
- 150. Martin, M., et al., Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and

- cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. Ann Oncol, 2003. **14**(6): p. 833-42.
- 151. Buchsbaum, D.J., T. Zhou, and A.F. Lobuglio, *TRAIL receptor-targeted therapy.* Future Oncol, 2006. **2**(4): p. 493-508.
- 152. Buchsbaum, D.J., et al., Antitumor efficacy of TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody alone or in combination with chemotherapy and/or radiation therapy in a human breast cancer model. Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3731-41.
- 153. Chinnaiyan, A.M., et al., Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1754-9.
- 154. Keane, M.M., et al., Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. Cancer Res, 1999. **59**(3): p. 734-41.
- 155. Garimella, S.V., A. Rocca, and S. Lipkowitz, *WEE1 inhibition sensitizes basal breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis.* Mol Cancer Res, 2012. **10**(1): p. 75-85.
- 156. Oliver, P.G., et al., *Effect of anti-DR5 and chemotherapy on basal-like breast cancer.*Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(2): p. 417-26.
- 157. Kazhdan, I. and R.A. Marciniak, *Death receptor 4 (DR4) efficiently kills breast cancer cells irrespective of their sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. Cancer Gene Ther, 2004. **11**(10): p. 691-8.
- 158. Zhang, Y. and B. Zhang, TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. Mol Cancer Res, 2008. **6**(12): p. 1861-71.
- 159. Amm, H.M., et al., *Mechanisms of drug sensitization to TRA-8, an agonistic death receptor 5 antibody, involve modulation of the intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells.* Mol Cancer Res, 2011. **9**(4): p. 403-17.
- 160. Kim, K., et al., *Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 335-46.
- 161. Shin, M.S., et al., *Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers.* Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 4942-6.
- 162. Thomas, P.A., et al., Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2698-703.
- 163. Hori, T., et al., *Ionizing radiation enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulations of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) in human osteosarcoma cells.* J Orthop Res, 2010. **28**(6): p. 739-45.
- 164. Rousseau, C., et al., The N-terminal of the estrogen receptor (ERalpha) mediates transcriptional cross-talk with the retinoic acid receptor in human breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **86**(1): p. 1-14.
- 165. Uray, I.P. and P.H. Brown, *Chemoprevention of hormone receptor-negative breast cancer: new approaches needed.* Recent Results Cancer Res, 2011. **188**: p. 147-62.
- 166. Bacus, S.S., et al., Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. Mol Carcinog, 1990. **3**(6): p. 350-62.
- 167. Perez-Yepez, E.A., et al., Selection of a MCF-7 Breast Cancer Cell Subpopulation with High Sensitivity to IL-1beta: Characterization of and Correlation between Morphological and Molecular Changes Leading to Increased Invasiveness. Int J Breast Cancer, 2012. 2012: p. 609148.
- 168. Burdall, S.E., et al., *Breast cancer cell lines: friend or foe?* Breast Cancer Res, 2003. **5**(2): p. 89-95.
- 169. Lacroix, M. and G. Leclercq, *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.* Breast Cancer Res Treat, 2004. **83**(3): p. 249-89.

- 170. Yang, Q., T. Sakurai, and K. Kakudo, *Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2002. **76**(2): p. 167-73.
- 171. Brtko, J., Retinoids, rexinoids and their cognate nuclear receptors: character and their role in chemoprevention of selected malignant diseases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2007. **151**(2): p. 187-94.
- 172. Shang, Y., C.R. Baumrucker, and M.H. Green, Signal relay by retinoic acid receptors alpha and beta in the retinoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 18005-10.
- 173. Thompson, E.W., et al., Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. J Cell Physiol, 1992. **150**(3): p. 534-44.
- 174. Sachdev, J.C. and M. Jahanzeb, *Blockade of the HER family of receptors in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer.* Clin Breast Cancer, 2012. **12**(1): p. 19-29.
- 175. Tari, A.M., et al., *Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells.* Oncogene, 2002. **21**(34): p. 5224-32.
- 176. Offterdinger, M., et al., *Retinoids control the expression of c-erbB receptors in breast cancer cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(3): p. 907-13.
- 177. Flicker, S.H., et al., *Tyrosine kinase signaling pathways control the expression of retinoic acid receptor-alpha in SK-BR-3 breast cancer cells.* Cancer Lett, 1997. **115**(1): p. 63-72.
- 178. Anninga, J.K., et al., Overexpression of the HER-2 oncogene does not play a role in high-grade osteosarcomas. Eur J Cancer, 2004. **40**(7): p. 963-70.
- 179. Amm, H.M., et al., Combined modality therapy with TRAIL or agonistic death receptor antibodies. Cancer Biol Ther, 2011. **11**(5): p. 431-49.
- 180. Lagadec, C., et al., *Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells.* Oncogene, 2008. **27**(10): p. 1472-7.
- 181. Kendrick, J.E., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)* and its therapeutic potential in breast and gynecologic cancers. Gynecol Oncol, 2007. **106**(3): p. 614-21.
- 182. Cuello, M., et al., Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4892-900.
- 183. Kong, G., et al., *The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, down-regulates cyclooxygenase-2 expression in human breast cells through transcription factor crosstalk: implications for molecular-based chemoprevention.* Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3462-9.
- 184. IARC Handbooks of Cancer Prevention Volume 4 Retinoids, 1999. p. 128, 188.
- 185. Miller, V.A., et al., *Initial clinical trial of the retinoid receptor pan agonist 9-cis retinoic acid.* Clin Cancer Res, 1996. **2**(3): p. 471-5.
- 186. Ozpolat, B., et al., *Pharmacokinetics of intravenously administered liposomal all-trans- retinoic acid (ATRA) and orally administered ATRA in healthy volunteers.* J Pharm Pharm Sci, 2003. **6**(2): p. 292-301.
- 187. Estey, E., et al., Alterations in tretinoin pharmacokinetics following administration of liposomal all-trans retinoic acid. Blood, 1996. **87**(9): p. 3650-4.
- 188. Kurzrock, R., E. Estey, and M. Talpaz, *All-trans retinoic acid: tolerance and biologic effects in myelodysplastic syndrome.* J Clin Oncol, 1993. **11**(8): p. 1489-95.
- 189. Sonnemann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitor-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in childhood malignancies is not associated with upregulation of TRAIL receptor expression, but with potentiated caspase-8 activation.* Cancer Biol Ther, 2012. **13**(6): p. 417-24.
- 190. Mirandola, P., et al., Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand downmodulating IAP family proteins. Int J Oncol, 2006. **28**(1): p. 127-33.

- 191. Sun, S.Y., et al., *Mechanisms of apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human non-small cell lung carcinoma cells.* Oncogene, 1999. **18**(14): p. 2357-65.
- 192. Sun, S.Y., et al., *Implication of p53 in growth arrest and apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human lung cancer cells.* Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2829-33.
- 193. Shao, Z.M., et al., *p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells.* Oncogene, 1995. **11**(3): p. 493-504.
- 194. Sun, S.Y., P. Yue, and R. Lotan, *Implication of multiple mechanisms in apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human prostate carcinoma cells.* Oncogene, 2000. **19**(39): p. 4513-22.
- 195. Pan, G., et al., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science, 1997. **277**(5327): p. 815-8.
- 196. Armeanu, S., et al., Adenoviral gene transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand overcomes an impaired response of hepatoma cells but causes severe apoptosis in primary human hepatocytes. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2369-72.

7 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Annekathrin Kratz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige

Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Kombinationseffekte

von TRAIL und Retinoiden an Zellkulturmodellen des Mammakarzinoms und des

Osteosarkoms" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und

keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer

Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements

for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte

zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische

Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen)

entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die

in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben

sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei

denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen

einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind

mir bekannt und bewusst."

Datum 18.02.2015

Unterschrift

109

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Professor Dr. med. Possinger für die Überlassung jenes in dieser Arbeit behandelten Forschungsthemas sowie Herrn PD Dr. med. Eucker für die engagierte Übernahme und Weiterführung der Betreuung meiner Promotion in der Funktion des Doktorvaters, für die Gewinn bringenden beratenden Gespräche und für die kompetente Unterstützung der Fertigstellung meiner Dissertationsschrift danken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Elstner für ihr großzügiges Vertrauen, die energische und resolute Unterstützung die uneingeschränkte Bereitschaft, im Interesse unserer Forschung auch unbequeme Angelegenheiten zu regeln. Ohne sie hätte diese Arbeit nicht zustande kommen können.

Auch möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Liu und Herrn Dr. rer. nat. Zang dafür bedanken, dass sie mit ihrem umfassenden Wissens- und Erfahrungsschatz sowohl in methodischen als auch in fachlichen Angelegenheiten stets präsent waren.

Ein aufrichtiges Dankeschön möchte ich an dieser Stelle der Arbeitsgruppe "Pulmonale Infektion und Molekulare Bildgebung", insbesondere Herrn Dr. med. Hocke (M.Sc.) und Frau Dr. rer. nat. Mieth, aussprechen.

Auch Frau Dr. med. Lamottke und Frau Dr. med. Feldmann verdienen meinen aufrichtigen Dank.

Besondere Erwähnung möchte ich an dieser Stelle meiner Familie widmen, die mir nicht nur während meines Studiums vielgestaltige Unterstützung und großes Vertrauen schenkte, sondern deren Verständnis und Geduld mir die Freiheit und die innere Ruhe gewährten, meine Ziele mit jener Gewissenhaftigkeit zu verfolgen, die mir angemessen erschien.

Von ganzem Herzen danke ich vor allem meinen Eltern Petra Kratz und Dietmar Kratz sowie Ludwig und Christine Reinhardt.

Abschließend und ganz besonders danke ich an dieser Stelle Thomas Reinhardt.