

Neue therapeutische Strategien für die  
Apoptose-Induktion  
im Hepatozellulären Karzinom

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Kristin Wahl

geboren am 22.12.1982 in Sangerhausen

2012

Referentin: Prof. Dr. Heike Bantel

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Schwinzer

Tag der Promotion: 12.11.2012

*Für meine Familie*

---

*Man muss das Unmögliche versuchen, um das Mögliche  
zu erreichen.*

*Hermann Hesse 1877-1962*

---

## INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung .....	6
Abstract .....	7
<b>A EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
Leber und Hepatozelluläres Karzinom .....	8
Apoptotischer Zelltod .....	10
Signalwege der Apoptose .....	11
TRAIL ( <i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand</i> ) .....	13
Proteasom-Inhibition .....	16
Ziele dieser Arbeit .....	18
<b>B MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>Material .....</b>	<b>19</b>
Geräte .....	19
Verbrauchsmaterialien .....	19
Chemikalien .....	20
Oligonukleotide .....	22
Antikörper .....	22
Primäre Antikörper .....	22
Sekundäre Antikörper .....	23
Medien .....	24
Puffer .....	24
Zelllinien .....	26
<b>Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>Zellbiologische Arbeiten .....</b>	<b>26</b>
Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation .....	26
Zellkulturbedingungen für HepG2 und Huh7 .....	26
Zellkulturbedingungen für PHH .....	26
Zellzählung .....	27
Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen .....	27
Inkubationsbedingungen für humanes, intaktes gesundes und HCC- Lebergewebe .....	27
Fusionskonstrukte scTRAIL und αEGFR-scTRAIL .....	28
Apoptose-Induktion durch Bortezomib und/oder scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL von Zellen oder Gewebe .....	28
Kristallviolett-Färbung .....	28

<b>Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>29</b>
Isolierung von Gesamt-RNA	29
cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	29
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
Gelelektrophorese	30
RT-PCR mit SYBR-Green	30
<b>Proteinbiochemische Arbeiten</b>	<b>31</b>
Präparation von Gesamtzellextrakten	31
Präparation von Proteinextrakten aus Lebergewebe	32
Proteinbestimmung durch BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay	32
Proteinquantifizierung	32
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
Western Blot	33
Caspase-Glo 3/7 Assay	33
M30 Cytodeath ELISA	34
<b>Immunhistochemische Arbeiten</b>	<b>35</b>
Anfertigung von Kryo-Gewebeschnitten	35
Aminoethylcarbazol (AEC)-Färbung	35
TUNEL-Färbung (TdT-vermittelte dUTP <i>nick end labeling</i> )	36
<b>Software</b>	<b>36</b>
<b>Statistik</b>	<b>36</b>
<b>C ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
Nachweis der EGF-Rezeptor Expression	37
Zelltod-Induktion durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in Huh7 und PHH	38
Caspasen-Aktivierung und Zelltod durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in Huh7 und PHH	40
Nachweis der TRAIL-induzierten Effektor- und Initiatorcaspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in Huh7 und PHH	43
Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib im gesunden und HCC-Lebergewebe	47
TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Expression nach Bortezomib-Behandlung im gesunden und HCC-Lebergewebe	50
Nachweis von Effektorcaspase-3 und Cytokeratin-18 im HCC-Lebergewebe	51
Zelltod-Analyse von HCC-Lebergewebe nach Behandlung mit scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib	55

Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib im tumorfreen und HCC-Lebergewebe .....	57
<b>D DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
<b>E FAZIT &amp; AUSBLICK .....</b>	<b>64</b>
<b>F ANHANG .....</b>	<b>66</b>
Literaturverzeichnis .....	66
Abbildungsverzeichnis .....	79
Abkürzungsverzeichnis .....	81
Lebenslauf .....	83
Danksagung .....	85

## Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit und die Mortalitätsrate der betroffenen Patienten hat in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen (Blum et al., 2007). Ein Grund dafür sind die limitierten Behandlungsmöglichkeiten, da nur für ca. 50% der Patienten eine kurative Therapie wie Resektion, Transplantation sowie lokal ablativ Verfahren bei noch nicht fortgeschrittener Erkrankung in Frage kommen. Bei der anderen Hälfte der Patienten sind, aufgrund des progressiven Stadiums ihrer Erkrankungen, die therapeutischen Möglichkeiten stark eingeschränkt. Deshalb sind neue therapeutische Strategien, die das Gesamtüberleben von HCC-Patienten mit guter Lebensqualität verlängern, dringend notwendig. TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) könnte sich als vielversprechende Substanz in der Tumorthherapie erweisen, da TRAIL im Gegensatz zu CD95L Apoptose in Tumorzellen, jedoch nicht in gesunden Zellen induziert (Ashkenazi et al., 1999). Allerdings zeigen viele Tumorzellen, u.a. auch Hepatoma-Zellen, eine TRAIL-Resistenz. Deshalb ist eine kombinierte Behandlung von TRAIL mit Substanzen wie dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib erforderlich, die durch verschiedene Mechanismen die Apoptose-Sensitivität des Tumorgewebes gegenüber TRAIL erhöhen (Koschny et al., 2007a). Da Bortezomib möglicherweise auch tumorfreies Lebergewebe gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensibilisiert, wäre zielgerichtetes TRAIL, das selektiv gegen das Tumorgewebe gerichtet ist, von großem Vorteil. In dieser Arbeit wurde in EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*) positiven Hepatoma-Zellen (Huh7) und erstmals auf humanem, intaktem, unfixiertem HCC-Lebergewebe unspezifisches TRAIL (scTRAIL) und Antigen-spezifisches TRAIL ( $\alpha$ EGFR-scTRAIL), das gegen den im HCC verstärkt exprimierten EGF-Rezeptor gerichtet ist, allein und in Kombination mit Bortezomib auf Apoptose-Induktion analysiert. Gleichzeitig wurde die Hepatotoxizität beider Proteine auf primären humanen Hepatozyten (PHH) und gesundem Lebergewebe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass zielgerichtetes TRAIL gegenüber der nicht zielgerichteten TRAIL-Version in Kombination mit Bortezomib zu einer höheren Apoptoserate in Hepatoma-Zellen bzw. im HCC-Gewebe führt. Dagegen wurde durch die beiden TRAIL-Versionen keine relevante Apoptoserate in PHH oder gesundem Lebergewebe erzielt. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zielgerichtetes TRAIL mit Bortezomib im tumorfreien zirrhotischen Lebergewebe keine verstärkte Apoptoserate hervorruft. Der Einsatz von zielgerichtetem TRAIL stellt somit einen neuen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar, der mit einer verstärkten Bioaktivität im Tumorgewebe und reduzierten *Off-Target*-Effekten assoziiert sein könnte.

Schlagworte: Hepatozelluläres Karzinom (HCC), TRAIL, Apoptose

**Abstract**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common solid tumors with increasing incidence worldwide (Blum et al., 2007). However, treatment options are limited so far due to the resistance of HCC to conventional chemotherapeutic agents. Therefore, there is a strong need for novel therapeutic strategies to enhance treatment response of HCC.

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) has been implicated as promising novel anticancer drug, since in contrast to other ligands of the TNF family, TRAIL selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal cells and therefore might not exert hepatotoxicity. However, most tumor cells including hepatocellular carcinoma cells reveal TRAIL resistance. Thus, combination of TRAIL with apoptosis sensitizing agents such as the proteasome inhibitor bortezomib is required (Koschny et al., 2007a). In this study we have analyzed the pro-apoptotic efficacy of different versions of TRAIL, namely single chain (sc) TRAIL and a fusion protein of scTRAIL targeting epidermal growth factor receptor ( $\alpha$ EGFR-scTRAIL) which is upregulated in the majority of HCC tissues. We analyzed pro-apoptotic effects of both TRAIL versions alone and in combination with bortezomib in hepatoma cells (Huh7) and in primary human hepatocytes (PHH) as well as in intact HCC liver explants and healthy liver tissue. We demonstrated that EGFR-targeting TRAIL in combination with bortezomib induced significantly higher caspase activation and cell death in HCC cells and tissues but not in PHH and healthy liver. In contrast to HCC tissue, EGFR-targeting TRAIL in combination with bortezomib showed no toxicity to tumor free liver tissue of the respective individuals.

In conclusion,  $\alpha$ EGFR-scTRAIL revealed increased anti-tumoral activity towards HCC without inducing toxicity to tumor-free or healthy liver tissue. EGFR-targeting might therefore represent a promising strategy to selectively enhance bioactivity and to prevent off-target effects of cell death inducing agents in EGFR expressing HCC tissues.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma (HCC), TRAIL, apoptosis

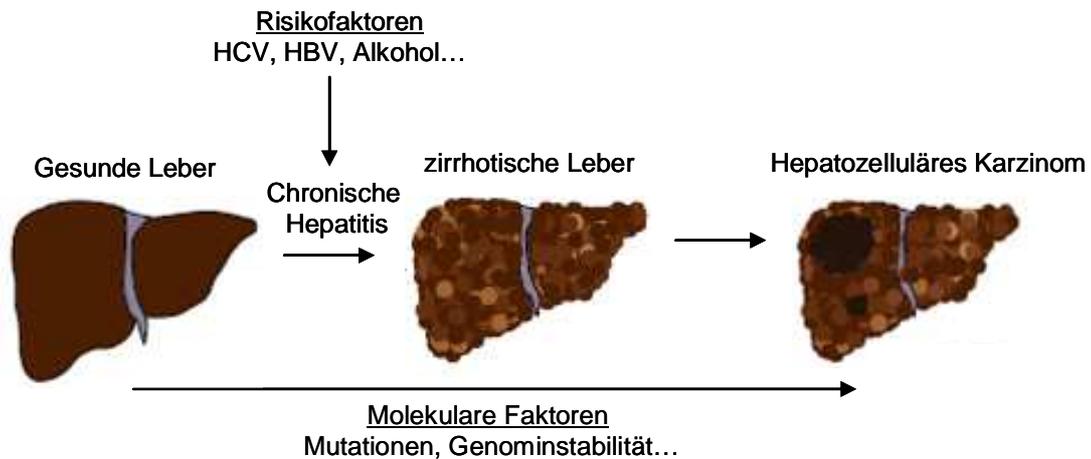
## A EINLEITUNG

### Leber und Hepatozelluläres Karzinom

Die Leber ist im menschlichen Körper die größte Verdauungsdrüse und sie übernimmt wichtige Stoffwechselfunktionen wie Aufbau von Glykogen, Bildung des Aminosäurepools für die Proteinbiosynthese und Bildung von Harnstoff. Des Weiteren ist dieses Organ für die Produktion von Galle und den damit verbundenen Entgiftungsvorgängen verantwortlich. Die Leber ist ca. 1,5 kg schwer und von einer Kapsel aus Bindegewebe umgeben. Die Leber ist in 8 Lebersegmente untergliedert, die in Leberläppchen (Lobuli hepatis) unterteilt sind, die wiederum aus konzentrisch um eine Lebervene angeordneten Leberbälkchen mit säulenartig aufgereihten Leberzellen (Hepatozyten) bestehen. Ca. 60% aller Zellen bzw. 80% des Lebervolumens sind Hepatozyten (Arterburn et al., 1995). Durch akute oder chronische Entzündungen, verursacht durch toxische, virale, metabolische, autoimmune oder cholestatische Einflüsse, kommt es zum Umbau des normalen Lebergewebes (Fibrosierung). Eine fortgeschrittene Leberfibrose kann u.a. zur Leberzirrhose mit fortschreitender Einschränkung der Leberfunktion und mit dem Risiko der Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms führen (Gines et al., 2004).

Die Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem es u.a. zu genetischen Veränderungen und schließlich zum unkontrollierten Wachstum der Zellen kommt. Laut Hanahan und Weinberg gibt es verschiedene biologische Kennzeichen der Onkogenese. Diese sind u.a. die Autarkie der Wachstumsfaktoren, das fehlende Ansprechen auf Wachstums-inhibierende Signale, die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung, das ungehemmte Replikationspotential, die gesteigerte Freisetzung und Expression von proangiogenen Faktoren, sowie die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose) (Hanahan et al., 2000).

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten Krebs-Arten mit einer geschätzten Rate der Neuerkrankungen von 500.000 bis zu 1 Mio. Fällen pro Jahr, wobei die globale Inzidenz zunehmend ist (El-Serag, 2011). Als Ursachen kommen chronische Virushepatitis C und B/D, Hämochromatose, alkoholische Leberschädigung oder nicht alkoholische Fettlebererkrankung (NASH) in Betracht, die zu Entzündungsreaktionen im Lebergewebe und schließlich zum fibrotischen/zirrhosischen Leberumbau führen (Abb.1) (Cornella et al., 2011).



**Abb.1: Humane Hepatokarzinogenese.** Durch chronische Leberschädigung, verursacht durch z.B. virale Hepatitis oder Alkohol, kommt es bei vielen Patienten zur Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms auf dem Boden einer Leberzirrhose. Die verschiedenen Stadien der Hepatokarzinogenese werden von verschiedenen externen und internen Faktoren beeinflusst. Abbildung verändert nach Cornella et al. 2011.

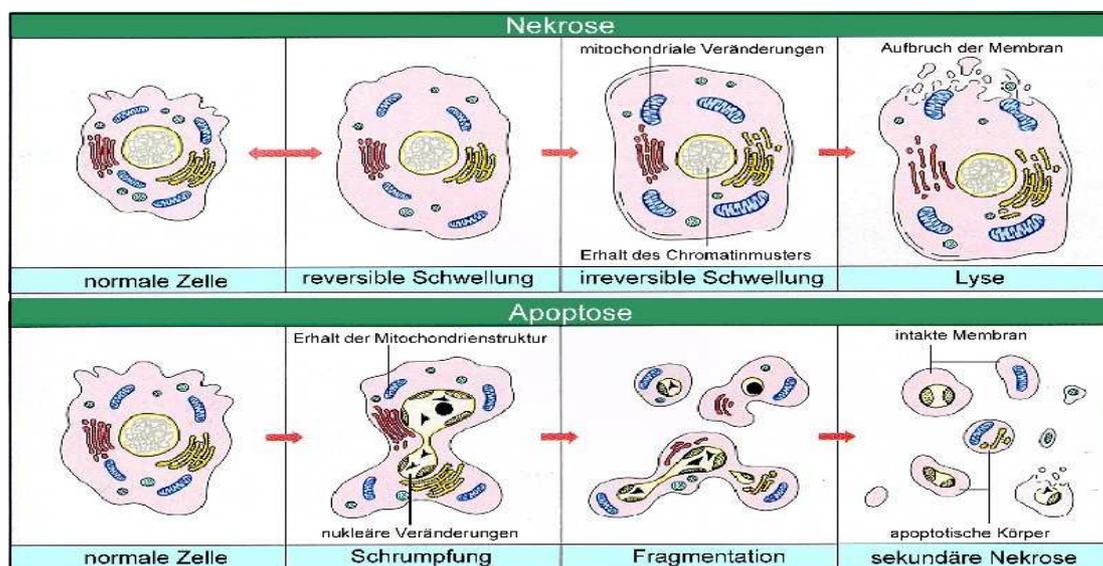
Die Diagnose des HCC ist teilweise sehr schwierig, da es häufig bis zu einem späten Stadium unbemerkt bleibt und klinisch asymptomatisch verläuft. Selbst früh entdeckt, sind die Behandlungsmöglichkeiten limitiert. Die Wahl für die verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten ist sowohl abhängig von der Leberfunktion als auch vom Tumorstadium. Nur für ca. 50 % aller HCC Patienten kommen kurative Therapieverfahren wie chirurgische Resektion, Lebertransplantation, lokal ablativ Verfahren wie Radiofrequenzablation oder perkutane Ethanolinjektion aufgrund ihres lokal begrenzten Tumorbefalls und fehlender extrahepatischer Metastasierung in Frage. Die palliative Therapie des HCC ist stark eingeschränkt, da sich das HCC gegenüber systemischen, konventionellen Chemotherapeutika als resistent erweist (Fornier et al., 2012).

Zielgerichtete Therapien, die individuelle Tumorsignalwege berücksichtigen, erweisen sich zunehmend als vielversprechende Strategie. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch den Multikinase-Inhibitor Sorafenib das mittlere Überleben der Patienten mit HCC im fortgeschrittenen Stadium gegenüber Placebo signifikant verlängert werden konnte (Llovet et al., 2008). Allerdings betrug der Überlebensvorteil in der Verumgruppe nur 3 Monate, so dass weitere noch effektivere Therapiestrategien zur Behandlung des fortgeschrittenen HCC wünschenswert sind. Ziel der Tumortherapien ist das Eingrenzen des Tumors durch

Induktion von Tumorzelltod ohne Schädigung der nicht transformierten Zellen im benachbarten Gewebeverband.

### Apoptotischer Zelltod

Es werden verschiedene Arten des Zelltodes, Nekrose und Apoptose, unterschieden. Bei der Nekrose kommt es zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zelle mit Freisetzung des Zellinhaltes, wodurch eine Entzündungsreaktion und somit die Schädigung des umliegenden Gewebes hervorgerufen wird (Malhi et al., 2006; Nanji et al., 1997; Trauth et al., 1995).



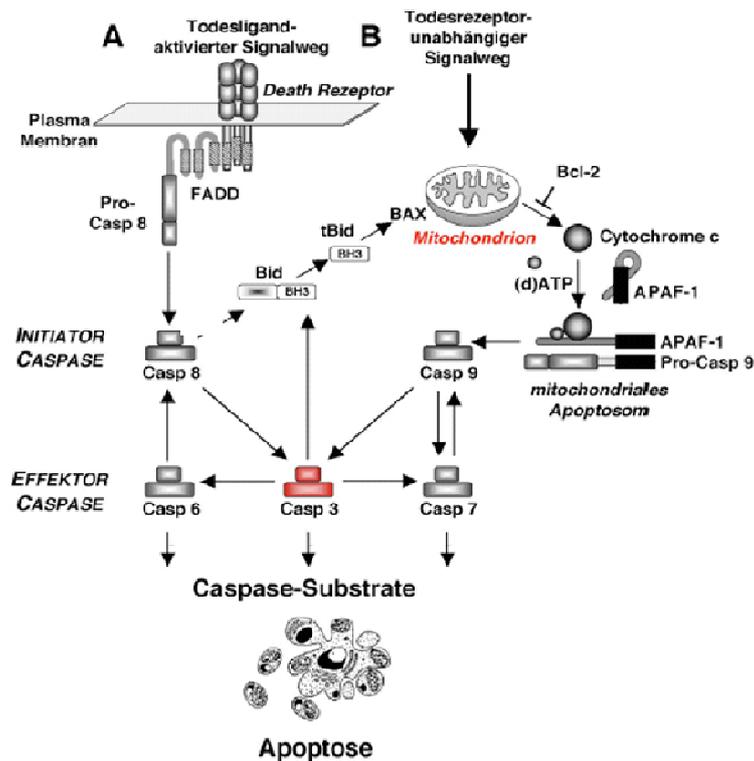
**Abb.2: Vergleich zwischen Nekrose und Apoptose.** Bei der Nekrose kommt es aufgrund von Elektrolytverschiebungen zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zelle, wobei der Zellinhalt freigesetzt wird. Bei der Apoptose kommt es zunächst zur Kondensation des nukleären Chromatins und des Zytoplasmas, gefolgt von der Ausstülpung der Zellmembran. Dabei werden sogenannte „apoptotischen Körperchen“ gebildet, die von umgebenen Zellen phagozytiert und durch Lysosomen abgebaut werden. Abbildung aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keesey, 1995.

Im Gegensatz zur Nekrose dient die Apoptose der Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts einer Zellpopulation. Diese Art des Zelltodes ist nach einem bestimmten Ablauf reguliert und wird deshalb auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Apoptose ist ein aktiver Prozess, der morphologisch und biochemisch durch bestimmte Merkmale wie Chromatin-Kondensation, Zell-Schrumpfung sowie Einschnürung des Zytoplasmas und des

Zellkerns in membrangebundene Vesikel, sogenannte „apoptotische Körperchen“, gekennzeichnet ist. Diese werden *in vivo* von Makrophagen oder dendritischen Zellen erkannt und rasch phagozytiert, wobei dieser Prozess keine Entzündungsreaktion hervorruft. Eine Störung der Balance zwischen Zelltod und -neubildung spielt in der Pathogenese von Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Eine verringerte Apoptoserate wird z.B. in der Tumorentwicklung vermutet, während bei neurodegenerativen und einigen viralen bzw. bakteriellen Erkrankungen eine erhöhte Apoptoserate postuliert wird (Neuman, 2001; Osawa et al., 2009).

### Signalwege der Apoptose

Apoptose wird durch eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli wie z.B. Liganden der Todesrezeptor-Familie (CD95L, TNF, TRAIL), mikrobielle bzw. virale Infektionen, Chemotherapeutika oder ionische Strahlung induziert. Prinzipiell werden zwei verschiedene Signalwege, der extrinsische (Todesrezeptor-vermittelte) und der intrinsische (mitochondriale) Signalweg unterschieden (Daniel, 2002; Guicciardi et al., 2005). Durch diese Signalwege werden kaskadenartig Cystein-Proteasen, sogenannte Caspasen, aktiviert. Dabei aktivieren Initiatorcaspasen wie Caspase-8, -9 oder -10 nachfolgende Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 oder -7 (Martinon et al., 2004). Effektorcaspasen spalten die für die Zellfunktion und -integrität wichtigen Proteine wie beispielsweise Cytokeratin-18, ein Intermediärfilamentprotein, das von epithelialen Zellen und somit auch von Hepatozyten exprimiert wird. Nach Bindung von Todesliganden wie TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*), CD95L oder TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) an ihren spezifischen Rezeptor werden das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated protein with death domain*) sowie die inaktiven Vorstufen der Initiatorcaspasen an den intrazellulären Rezeptoranteil rekrutiert, wodurch der sogenannte Todesrezeptor-Komplex (DISC, *death inducing signaling complex*) gebildet wird. Dadurch kommt es zur autoproteolytischen Aktivierung der Initiatorcaspasen die nachfolgend Effektorcaspasen aktivieren. Diese Proteasen spalten eine Vielzahl von Substraten und induzieren dadurch den apoptotischen Zelltod. Der beschriebene extrinsische Signalweg findet in sogenannten Typ-I-Zellen statt und kann am DISC-Komplex durch cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) inhibiert werden.



**Abb.3: Extrinsischer (Todesrezeptor-vermittelter) und intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg der Apoptose.** Bei dem extrinsischen Signalweg der Apoptose (A) erfolgt durch die Bindung des spezifischen Liganden, z.B. TRAIL, an seinen Rezeptor die Formation des Todesrezeptor-Komplexes, bestehend aus Adaptorprotein FADD (*Fas-associated protein with death domain*), Pro-Caspase-8 und dem intrazellulären Rezeptoranteil. Dabei kommt es zur autoproteolytischen Aktivierung von Initiatorcaspase-8, die wiederum u.a. Effektorcaspase-3 aktiviert. Es kommt zur Spaltung einer Vielzahl an zellulären Substraten, wodurch der apoptotische Zelltod induziert wird. In Typ-II-Zellen, wie Hepatozyten, wird durch die Aktivierung der Caspase-8 das pro-apoptotische Molekül Bid (*truncated BH3 interacting domain death agonist*) gespalten, das als Bindeglied zum intrinsischen Signalweg die Aktivierung der Effektorcaspasen verstärkt. Beim intrinsischen Signalweg (B) wird über DNA-Schädigung das pro-apoptotische Molekül Bax (*Bcl-2-associated X protein*) aktiviert, das die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert. Cytochrom c bildet mit dem Adapterprotein APAF-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Pro-Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, das wiederum die Initiatorcaspase-9 aktiviert und nachfolgend die Aktivierung der Effektorcaspase 3 bewirkt. Anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2/Bcl-xL (*B-cell lymphoma 2/ B-cell lymphoma-extra large*) können die Cytochrom c Freisetzung inhibieren. Abbildung verändert nach Daniel et al. 2002.

In Typ-II Zellen, z.B. Hepatozyten, wird der extrinsische Signalweg durch den intrinsischen Signalweg verstärkt. Dabei ist die über den Todesrezeptor aktivierte Caspase-8 nicht ausreichend, um den Zelltod über Effektorcaspasen zu induzieren. In diesen Zellen vermittelt

Caspase-8 eine Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid (*truncated BH3 interacting domain death agonist*), das zur Aktivierung des intrinsischen Signalweges führt. Der intrinsische, mitochondriale Signalweg kann durch extra- und intrazelluläre Signale wie UV-Strahlung oder oxidativen Stress ausgelöst werden. Es kommt zur Aktivierung von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie Bax, Bak, Bim oder Noxa, die eine mitochondriale Cytochrom c Freisetzung induzieren. Ähnlich wie der DISC beim extrinsischen Signalweg, bildet das zytosolische Cytochrom c mit dem Adapterprotein Apaf-1 und der Procaspase-9 das Apoptosom. Dies führt zur autoproteolytischen Aktivierung der Initiatorcaspase-9 und nachfolgend zur Aktivierung der Effektorcaspasen -3, -6 und -7, deren Substratspaltung in der Induktion des apoptotischen Zelltodes resultiert. Der intrinsische Signalweg kann durch anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie inhibiert werden (Schulze-Osthoff et al., 1998).

### **TRAIL (*Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*)**

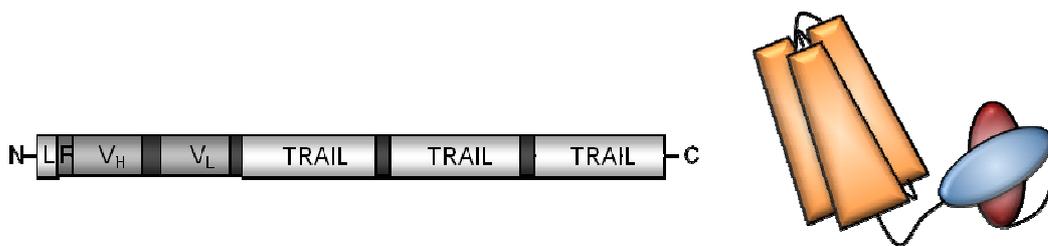
Humanes TRAIL, auch Apo2L, ist ein Typ-II Transmembran-Protein der TNF-Superfamilie (Wiley et al., 1995). Der Ligand besteht aus 281 AS und wird mit einer kurzen zytoplasmatischen N-terminalen Domäne und einer langen C-terminalen Rezeptorbindungsdomäne exprimiert. Lösliches TRAIL (*soluble*, sTRAIL), das eine homotrimere Struktur aufweist und 3 Rezeptormoleküle bindet, entsteht durch die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne von der Zelloberfläche. Im Zentrum des Liganden befindet sich ein Zinkatom, das von den Cystein-Resten der Untereinheiten gebunden wird und für die Stabilität und biologische Aktivität des Homotrimers wichtig ist (Hymowitz et al., 2000). Im humanen Organismus kann TRAIL an 4 Rezeptoren binden, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2), wobei die beiden ersten agonistische und letztere antagonistische Rezeptoren sind. TRAIL-R1 und -R2 haben eine zytoplasmatische Todesdomäne, die für die Rekrutierung der Initiatorcaspasen essentiell ist. Die beiden Rezeptoren TRAIL-R3 und -R4 haben hingegen keine funktionelle intrazelluläre Domäne und tragen deshalb nicht zur Signaltransduktion bei (Bodmer et al., 2000; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2002). Die TRAIL-R1 und -R2 Expression auf der Zelloberfläche von normalen Zellen wie auch Hepatozyten ist relativ gering und oft zytoplasmatisch anstelle von membrangebunden (Ganten et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte Expression dieser beiden Rezeptoren auf einer Vielzahl von Tumorzellen, u.a. auch HCC-Zellen, nachgewiesen werden (Daniels et al., 2005; Ichikawa et al., 2001; Koehler et al., 2009; Rowinsky, 2005; Yamanaka et al., 2000). Andere Arbeiten zeigen, dass TRAIL-R1 und -R2 gegenüber TRAIL-R3 und -R4 im HCC verstärkt exprimiert

werden (Chen et al., 2003). In früheren Studien wurde postuliert, dass TRAIL-R1 sowohl durch lösliches als auch membrangebundenes TRAIL, während TRAIL-R2 vor allem durch die membrangebundene Form aktiviert wird (Mühlenbeck et al., 2000; Wajant et al., 2001).

Die Rolle von TRAIL in Tumorerkrankungen wird kontrovers diskutiert. In TRAIL-defizienten Mäusen zeigte sich, dass diese empfänglicher für chemisch induzierte als auch für spontan entwickelnde Tumore sind (Cretney et al., 2002; Takeda et al., 2002; Zerafa et al., 2005). Kontrovers dazu wurde *in vivo* demonstriert, dass TRAIL die Metastasierung von humanen pankreatischen Tumoren begünstigt (Trauzold et al., 2006) und das Fehlen von TRAIL-Rezeptoren in Mäusen die primäre Tumorentwicklung nicht beeinflusst, aber die Lymphknoten-Metastasierung fördert (Grosse-Wilde et al., 2008). TRAIL gilt als vielversprechendes neues Tumorthapeutikum, da gezeigt werden konnte, dass, im Gegensatz zu CD95L, TRAIL selektiv Apoptose in transformierten aber nicht in normalen Zellen auslöst (Griffith et al., 1999; LeBlanc et al., 2003). In klinischen Studien (Phase I und II) wurden die agonistischen TRAIL-R1 Antikörper Mapatumumab (HGS-ETR1) und TRAIL-R2 Antikörper Lexatumumab (HGS-ETR2) mit guter Verträglichkeit und antitumoraler Aktivität getestet (Greco et al., 2008; Plummer et al., 2007). Aufgrund von molekularen Veränderungen weisen viele Tumorzellen jedoch eine Resistenz gegenüber TRAIL auf, die durch die kombinierte Behandlung von TRAIL mit Apoptose-sensibilisierenden Substanzen oder konventionellen Chemotherapeutika umgangen werden kann (Dyer et al., 2007). Beispielsweise konnte im Kolonkarzinom-Modell bei Mäusen gezeigt werden, dass eine Kombination aus TRAIL mit konventionellen Chemotherapeutika zu antitumoralen Effekten im Gegensatz zu den jeweiligen Substanzen allein führte, wobei bei 50% der Tiere eine komplette Regression erzielt werden konnte (Naka et al., 2002). Des Weiteren konnte durch TRAIL kombiniert mit Bestrahlung eine Sensitivierung von TRAIL-resistenten Zellen bei Mamma- und Prostatakarzinom gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose erreicht werden (Shankar et al., 2004). In Leukämie-Zellen konnte durch die Vorbehandlung mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib der TRAIL-induzierte Zelltod potenziert werden. Sorafenib führte in diesen Zellen zur Herunterregulation der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-xL und Mcl-1 (Rosato et al., 2007). Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, der in der Klinik für die Behandlung von hämatologischen Malignitäten eingesetzt wird (Rajkumar et al., 2005), sensibilisiert *in vitro* Karzinom-Zellen u.a. auch Hepatoma-Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose (Ganten et al., 2005; Koschny et al., 2010; Koschny et al., 2007b). Jedoch birgt die kombinierte Gabe von TRAIL mit Proteasom-Inhibitoren auf HCC-Lebergewebe das Risiko der Hepatotoxizität auf benachbarten tumorfreiem Lebergewebe. Es konnte gezeigt werden, dass Bortezomib in Kombination mit TRAIL in primären, humanen Hepatozyten Toxizität hervorruft (Koschny et al., 2007a). Eine Verbesserung der tumorspezifischen Apoptose-

Induktion durch TRAIL mit Folge eines höheren Effektes im Tumorgewebe (*Target*-Effekt) mit Minimierung der Effekte im tumorfreien Gewebe (*Off-Target*-Effekt) wäre deshalb erstrebenswert. Dies könnte durch die Fusion des jeweiligen Wirkstoffes mit monoklonalen Antikörpern oder Antikörperfragmenten, die Oberflächenmarker der jeweiligen Tumorart erkennen, erzielt werden (Gerspach et al., 2009a; Wajant et al., 2011). Diese Strategie konnte bereits mit einem CD95L-Fusionsprotein, das gegen das Tumorstroma-Antigen FAP (*fibroblast activation protein*) gerichtet ist, erfolgreich umgesetzt werden. Dieses Fusionsprotein zeigte im Xenograft-Tumormodel inhibierende Effekte auf das Wachstum von FAP-positiven Tumorzellen (Bremer et al., 2006; Samel et al., 2003). Der EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, erbB1/Her1 neu) ist im HCC verstärkt exprimiert und mit schlechter Prognose assoziiert (Bremer et al., 2006; Buckley et al., 2008; Furuse, 2008). Das therapeutische Potential von rekombinanten EGF-Rezeptor spezifischen TRAIL-Fusionsproteinen wäre daher eine innovative Strategie zur Behandlung von EGF-Rezeptor positiven Tumoren (Beuttler et al., 2009).

In Vorarbeiten wurde *single chain* TRAIL (scTRAIL, nicht zielgerichtetes TRAIL), bestehend aus drei durch Peptid-Linker fusionierten extrazellulären TRAIL-Domänen, mit einem humanisierten anti-EGF-Rezeptor spezifischen Antikörper-Derivat fusioniert, wodurch eine zielgerichtete Tumorantigen-spezifische TRAIL-Version generiert wurde (zielgerichtetes TRAIL,  $\alpha$ EGFR-TRAIL).



**Abb.4: Design der rekombinanten TRAIL-Fusionsproteine.** Für das Fusionsprotein *single chain* TRAIL (scTRAIL) wurden drei humane TRAIL-Domänen (AS 95-281) mit einem Peptid-Linker fusioniert. EGF-Rezeptor spezifische scFv-Antikörperfragmente ( $V_H$  und  $V_L$ ) wurden N-terminal an scTRAIL fusioniert. L Leader-Sequenz; scFv *single chain variable fragment*, F Flag-Tag; TRAIL human TRAIL AS 95-281. (Schneider et al., 2010; Siegemund et al., 2012)

Beide Fusionsproteine verfügen über ein N-terminales Signalpeptid, das bei der Herstellung zur Sezernierung der Proteine in den Zellkulturstand benötigt wird, gefolgt von einem Flag-Tag zur Detektion und Reinigung der Proteine. C-terminal schließt sich beim scTRAIL das

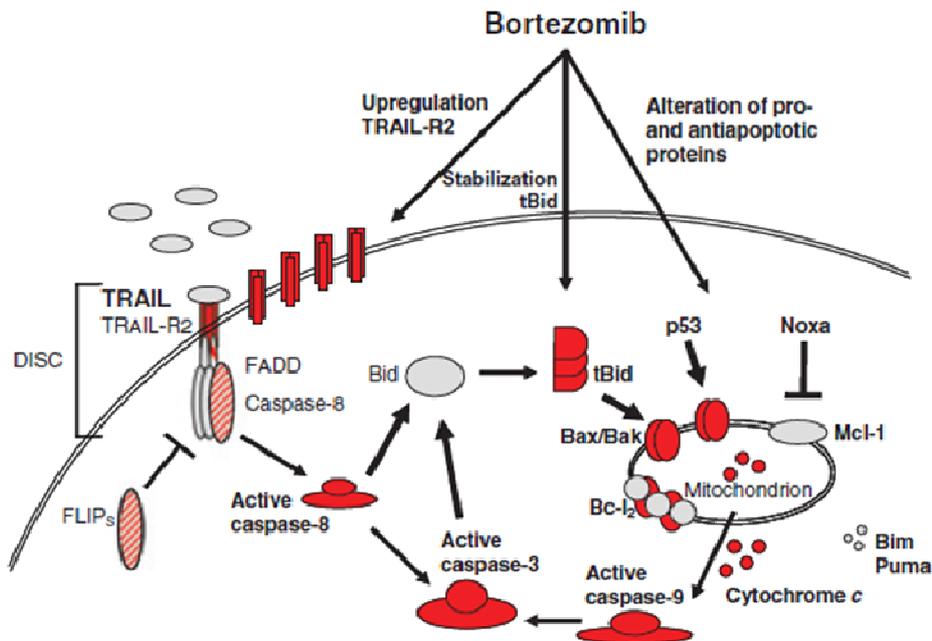
über (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>-Linker verbundene TRAIL-Trimer an. Beim αEGFR-TRAIL wurde ein humanisiertes *single chain variable fragment* (scFv) hu225, das vom chimären anti-EGFR monoklonalen Antikörper Cetuximab (C225) abgeleitet ist, an den N-Terminus des scTRAIL fusioniert. Für das rekombinante Einzelketten scTRAIL und das TRAIL-Fusionsprotein αEGFR-TRAIL, mit Spezifität für das humane Oberflächenantigen EGF-Rezeptor, konnten mit Hilfe eines neuen Proteindesigns die pharmakokinetischen Eigenschaften und die Bioaktivität gegenüber dem nicht-kovalenten Homotrimer TRAIL *in vitro* verbessert und eine höhere Stabilität erreicht werden. Mit Hilfe dieses Antigen-spezifischen Fusionsmoleküls wird funktionell membrangebundenes TRAIL imitiert, das selektiv Apoptose in Tumorzellen hervorruft (Schneider et al., 2010; Siegemund et al., 2012).

### **Proteasom-Inhibition**

Das Proteasom ist ein hetero-oligomerer Proteinkomplex mit einer Größe von 2000 kDa, der sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch in eukaryotischen Zellen lokalisiert ist. Es spielt eine essentielle Rolle in der Homöostase zwischen Proteinsynthese und -degradation. Proteasomal abgebaut werden u.a. zelleigene Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusfaktoren sowie fehlerhaft gefaltete Proteine aber auch zellfremde Proteine, z.B. von viralen Erregern. Zunächst erfolgt ein kaskadenartiger Prozess der Poly-Ubiquitinierung der Proteine, gefolgt von deren Abbau im katalytischen Zentrum, der 20S Kerneinheit des Proteasoms. Die durch den Abbau freigesetzten Peptide werden zytoplasmatisch über Exo- und Endonukleasen weiter degradiert und u.a. über MHC-Klasse I Moleküle präsentiert. Mit Hilfe des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges werden mehr als 80 % aller zellulären Proteine degradiert, die in Prozesse wie den Zellzyklus, Proliferation und Apoptose involviert sind (Crawford et al., 2011).

Zunächst wurden Proteasom-Inhibitoren in der Grundlagenforschung eingesetzt, um mehr Erkenntnisse über das Ubiquitin-Proteasom-System zu erlangen, wobei inzwischen einige Proteasom-Inhibitoren Einzug in die Klinik halten (Stanford et al., 2003). Die meisten Proteasom-Inhibitoren sind gegen die 20S Einheit des Proteasoms gerichtet und sie können in synthetische Analoga und natürliche Produkte kategorisiert werden. Zu den synthetischen Inhibitoren mit Peptid-Gerüst zählen α-Ketoamide und Borsäure-haltige wie Bortezomib, während Lactacystin und Epoxomicin natürliche Inhibitoren des Proteasoms sind (Myung et al., 2001). Bortezomib (VELCADE oder PS-341) ist ein modifizierter Dipeptidyl-Borsäure-haltiger Inhibitor des 26S-Proteasoms, wurde von Millenium Pharmaceuticals als Inc. (Cambridge, USA) entwickelt und im Jahr 2003 für die Behandlung von Patienten mit multiplem Myelom auf den Markt gebracht (Rajkumar et al., 2005; Voorhees et al., 2006).

Das mögliche Zusammenspiel von Bortezomib und TRAIL ist in der Abbildung 5 dargestellt und wurde in Experimenten mit Neuroblastoma-Zellen postuliert (Naumann et al., 2011). Bortezomib verstärkt die TRAIL-induzierte Spaltung von Bid zu tBid sowie seine Stabilisierung und Akkumulation in die mitochondriale Membran.



**Abb.5: Hypothese der synergistischen Interaktion von Bortezomib und TRAIL in Neuroblastoma Zellen.** Bortezomib verstärkt die TRAIL-induzierte Spaltung von Bid in tBid, seine Stabilisierung und Anreicherung in die mitochondriale Membran. Des Weiteren erhöht Bortezomib die Expression von p53 und Noxa sowie die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Bortezomib führt zur Hochregulierung des TRAIL-R2 auf der Zelloberfläche und zu einer verstärkten Rekrutierung der Caspase-8 zum DISC. Abbildung verändert nach Naumann et al. 2011.

Des Weiteren bewirkt Bortezomib eine erhöhte Oberflächen-Expression von TRAIL-R1 und -R2 und begünstigt die DISC-Formation. Bortezomib kann somit verschiedene proapoptotische Signalwege beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Kombination von Bortezomib mit TRAIL die Apoptose-Resistenz z.B. bei myeloischer Leukämie (Sayers et al., 2003), Prostatakrebs (Johnson et al., 2003; Thorpe et al., 2008), Darm- oder Blasenkrebs (Lashinger et al., 2005; Nagy et al., 2006) oder bei HCC (Ganten et al., 2005; Koschny et al., 2007a) aufgehoben werden kann.

## Ziel dieser Arbeit

Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich die meisten HCC-Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ohne Möglichkeit auf eine kurative Therapie. Aufgrund der Tatsache, dass das HCC eine Resistenz gegenüber bestimmten zytostatischen Substanzen aufweist, werden alternative Behandlungsstrategien dringend benötigt. TRAIL wird als mögliches neues Anti-Tumor-Therapeutikum gehandelt, da es, im Gegensatz zu CD95L, Apoptose selektiv in Tumorzellen, aber nicht in gesunden Zellen auslöst. In früheren Studien wurde gezeigt, dass einige Tumor-Zelllinien, auch Hepatoma-Zellen, resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sind. Jedoch konnte mit Hilfe des Proteasom-Inhibitors Bortezomib eine Apoptose-Sensitivität gegenüber TRAIL erreicht werden. Mit neuartigen TRAIL-Fusionsproteinen soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit sich ein tumorspezifisches TRAIL-Konstrukt gegenüber nicht tumorspezifischem TRAIL als vorteilhaft in Bezug auf die Apoptose-Induktion im Tumorgewebe erweist. Hierzu wurde ein gegen den EGF-Rezeptor gerichtetes TRAIL-Fusionsprotein getestet, da 50-70% der Patienten eine verstärkte Expression dieses Wachstumsfaktors im HCC-Lebergewebe aufweisen.

Experimentell soll die apoptotische Wirkung von nicht zielgerichtetem scTRAIL und zielgerichtetem EGF-R-spezifischen scTRAIL nach Sensitivierung mit Bortezomib zunächst auf primären, humanen Hepatozyten und Hepatoma-Zellen (Huh7) untersucht werden. Im nächsten Schritt soll durch das bereits etablierte *ex vivo* Modell die Chemosensitivität und die Apoptose-Effizienz der beiden TRAIL-Fusionsproteine in Kombination mit Bortezomib erstmals in humanem, intaktem, gesundem und HCC-Lebergewebe verifiziert werden. Auch der Einfluss der Konstrukte auf tumorfreies Gewebe im Vergleich zum Tumor-Gewebe der jeweiligen HCC-Patienten soll untersucht werden. Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass die antitumorale Wirkung von  $\alpha$ EGFR-TRAIL durch die Sensitivierung mit Bortezomib und die Tumor-(EGF-R) Spezifität des Zytokins, im Vergleich zur nicht tumorspezifischen TRAIL-Version, auf HCC-Zellen bzw. HCC-Gewebe gesteigert werden kann.

## B MATERIAL & METHODEN

### Material

#### Geräte

##### Name

Analysewaage  
 Centro Luminometer LB 960  
 CO<sub>2</sub>-Inkubator  
 FACS-Calibur  
 Kryotom CM3050S  
 Gelkammer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
 Gradienten-PCR Mastercycler  
 Heizblock  
 Kühlzentrifuge 5415R  
 Mikro-Dismembrator-S  
 Mikroskop  
 Netzteil für Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
 Pipetten  
 Sterilbank Herasafe KS  
 Sunrise Mikroplatten Absorbtiionsreader  
 Vortexer  
 Wasserbad  
 Wasserdeionisierungsanlage (Milli-Q-Plus)  
 X-Omat 1000

##### Bezugsquelle

Sartorius, Göttingen  
 Berthold, Bad Wildbad  
 Sanyo-Biomedical, Bad Nenndorf  
 BD Biosciences, Heidelberg  
 Leica, Solms  
 Biorad, München  
 Eppendorf, Hamburg  
 Stuart Scientific, Staffordshire, UK  
 Eppendorf, Hamburg  
 Sartorius, Göttingen  
 Olympus, Hamburg  
 Biometra, Jena  
 Gilson, Limburg-Offheim  
 Thermo Scientific, Braunschweig  
 Tecan GmbH, Crailsheim  
 MS2 Minishaker IKA  
 GFL, Burgwedel  
 Millipore, Billerica, USA  
 Kodak, Stuttgart

#### Verbrauchsmaterialien

##### Name

12well Zellkulturplatte  
 24well Zellkulturplatte  
 48well Zellkulturplatte  
 96well Zellkulturplatte (flat bottom)  
 Deckgläser 24x50mm  
 Eppendorfgefäße (1,5 und 2ml)  
 Falcon 15ml  
 Falcon 50ml

##### Bezugsquelle

Thermo Scientific, Braunschweig  
 Thermo Scientific, Braunschweig  
 Greiner Bio-one, Frickenhausen  
 Greiner Bio-one, Frickenhausen  
 Thermo Scientific, Braunschweig  
 Eppendorf, Hamburg  
 Greiner Bio-one, Frickenhausen  
 Greiner Bio-one, Frickenhausen

Filterpapier Whatman	GE Healthcare, München
Nalgene Cryogenic Vials	Thermo Scientific, Braunschweig
Menzelgläser-Objekträger Superfrost®Plus	Thermo Scientific, Braunschweig
Mikrotiter-Platten 96 well (black with white well)	Berthold, Bad Wildbad
PAP Pen	G. Kisker, Steinfurt
Pinzette	Omnilab, Bremen
Pipettenspitzen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PVDF-Membran	Biorad, München
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Sarstedt
T175cm <sup>2</sup> Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt
T75cm <sup>2</sup> Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt
Zellschaber 25cm, 17mm	Sarstedt, Sarstedt

## Chemikalien

### Name

40% Acrylamid  
 ABC Elite Kit  
 Aceton  
 AEC Solution  
 APS  
 Ascorbinsäure  
 Bacillol AF  
 BCA Protein Assay  
 BME Vitaminlösung  
 Bortezomib (PS-341)  
 BSA  
 Caspase-Glo 3/7 Assay  
 Collagen Typ I  
 DAPI  
 Dexamethason 21-phosphat Dinatriumsalz  
 DNase  
 DMEM low Glucose (1 g/l) GlutaMAX  
 DMSO  
 dNTP Mix  
 ECL Plus Western Blotting Detection Reagent  
 Ethanol

### Bezugsquelle

Biorad, München  
 Vectastain, Burlingame, USA  
 J.T. Baker, Deventer, Niederlande  
 Invitrogen, Darmstadt  
 Biorad, München  
 Sanorell Pharma, Bühl  
 BODE Chemie GmbH, Hamburg  
 Thermo Scientific, Braunschweig  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Selleck, Houston, USA  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Promega, Mannheim  
 Roche, Mannheim  
 Invitrogen, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Qiagen, Hilden  
 Invitrogen, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Promega, Mannheim  
 GE Healthcare, München,  
 J.T. Baker, Deventer, Niederlande

---

FKS	Biochrom AG, Berlin
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
GelTol Mounting Medium	Immunotech, Marseille, Frankreich
Gentamycin	Ratiopharm, Ulm
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
HCL (37%)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
HEPES	PAA, Pasching, Österreich
humanes Serum	PromoCell GmbH, Heidelberg
Huminsulin Normal 100	Lilly Pharma, Bad Homburg
<i>In situ</i> cell death detection kit (Fluorescein)	Roche, Mannheim
KCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
L-Ornithin-Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M30 Cytodeath ELISA	PEVIVA, Bromma, Schweden
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
MEM (modified Eagle Medium)	Invitrogen, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
NaCl (0,9%)-Lösung	Delta-Select, Dreieich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad, München
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Red Taq Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden
Sodium dodecyl sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SYBR GreenER qPCR SuperMix	Invitrogen, Darmstadt
TEMED	Biorad, München
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA
Tissue-Tek O.C.T. Cryo Molds	Sakura Finetek, Torrance, USA
Transcriptor High Fidelity cDNA-Synthese Kit	Roche, Mannheim
TRIS-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trizol	Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (30%)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
William´s E Medium GlutaMAX	Invitrogen, Darmstadt

### Oligonukleotide

Zielgen	Hersteller	Sequenz 5'-3'
GAPDH forward	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC
GAPDH reverse	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	TGA TGG CAT GGA CTG TGG TC
QuantiTec Primer Assay GAPDH	Qiagen, Hilden	
QuantiTec Primer Assay TRAIL-R1	Qiagen, Hilden	
QuantiTec Primer Assay TRAIL-R2	Qiagen, Hilden	

### Antikörper

#### Primäre Antikörper

Name	Spezies	Konzentrationen	Bezugsquelle	Lagerung
cleaved Caspase-3 (Asp175)	rabbit	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	-20°C
Caspase-8 (12F5)	mouse	1:500	Biocheck, Münster,	4°C

Flag-tagged CD95L		100ng/ml	Dr. Schmitz, Düsseldorf	4°C
GAPDH (14C10)	rabbit	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	-20°C
EGFR (2-1E1)	mouse	1:200	Zytomed Systems, Berlin	4°C
EGFR-PE (AY13)	mouse	10µl	Biolegend, San Diego, USA	4°C
M30	mouse	1:200	Roche,	4°C
QVAD (pan- Caspase-Inhibitor)		10µM	MP Biomedicals, Illkirch-Cedex, Frankreich	- 20°C
TRAIL (2E5)	mouse	1µg/ml	Enzolifescienes, Lörrach	-20°C
scTRAIL		100ng/ml	Prof. Pfizenmaier, Stuttgart	4°C
αEGFR-TRAIL		100ng/ml	Prof. Pfizenmaier, Stuttgart	4°C

### Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Konzentrationen	Bezugsquelle	Lagerung
anti-Flag M2		1µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	-20°C
anti-mouse HRP	goat	1:5000	Alexis Biochemicals, San Diego, USA	-20°C
anti-rabbit HRP	goat	1:5000	ZYMED Laboratories, San Francisco, USA	4°C

**Medien**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Verwendung</b>
Medium I	William´s Medium E GlutaMAX 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin 2mM L-Glutamin 100nM Dexamethason	PHH
Medium II	William´s Medium E GlutaMAX 1% Penicillin/Streptomycin 2mM L-Glutamin	PHH
Medium III	DMEM 1g Glucose 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	Huh7
Medium Lebergewebe	0,2g/l $MgCl_2 \cdot xH_2O$ 0,02g/l L-Ornithin-HCl 1% BME-Vitaminlösung 1% humanes Serum 0,1g/l L-Ascorbinsäure 20mM HEPES 50µg/ml Gentamycin 8µg/ml Dexamethason 4U/ml humanes Insulin	Humanes Lebergewebe

**Puffer**

Agarosegel	1% Agarose in 1x TAE
Blocking-Puffer	5% Magermilchpulver in 1x TBST
Laufpuffer für SDS-PAGE (10x; pH 8,3)	250mM TRIS-HCl 1,92M Glycin 0,1% SDS
Laufpuffer für SDS-PAGE (1x)	100ml 10x Laufpuffer ad 1l A. bidest
Lysispuffer (pH 7,4)	100mM Tris-HCl 10mM $MgCl_2$ 0,5% NP-40

---

	1% Protease-Inhibitor
	1% DTT
Proteinprobenpuffer (4x)	0,2ml 0,2% Bromphenolblau
	1,25ml Sammelgelpuffer
	2,5ml Glycerin
	2,0ml 10% SDS
	ad 9ml A. bidest
Proteinpuffer (pH 7,4)	50mM TRIS-HCl
	100mM KCl
	5% Glycerin
Sammelgel (4%)	3,15ml A. bidest
	0,5ml 40% Acrylamid
	1,25ml Sammelgel-Puffer
	50µl 10% SDS
	50µl 10% APS
	5µl TEMED
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	0,5M TRIS-HCl
Stripping-Puffer	0,2M NaOH
TAE Puffer (50x)	2M TRIS pH 8.0
	128mM EDTA
TBS (pH 7,5; 20x)	0,4M TRIS-HCl
	3M NaCl
Trenngel (12%)	4,3ml A. bidest
	3ml 40% Acrylamid
	2,5ml Trenngel-Puffer
	100µl 10% SDS
	100µl 10% APS
	10µl TEMED
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	1,5M TRIS-HCl
Transferpuffer (10x)	250mM TRIS-HCl
	1,92M Glycin
Transferpuffer (1x)	200ml Methanol
	100ml 10x Transferpuffer
	2ml 10% SDS
	ad 1l A. bidest

---

Waschpuffer (1xTBST)	50ml 20x TBS
	2ml Tween 20
	ad 1l A. dest.

## Zelllinien

Für die Experimente wurden die Hepatoma-Zelllinie HepG2 und Huh7 verwendet (p53Y220C Mutante; Kooperationspartner MHH). Primäre humane Hepatozyten (PHH) wurden im Labor von Prof. Dr. Nüssler (Universität Tübingen, Tübingen) (Nüssler et al., 2009) oder von Dr. Florian Vondran (Institut für Viszeralmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) isoliert und als Suspension zur Verfügung gestellt.

## Methoden

### Zellbiologische Arbeiten

#### Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen oder das Gewebe wurden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Labormaterialien aus Kunststoff und Lösungen wurden in feuchter Hitze für 20min bei 135°C autoklaviert. Glas und Metallgeräte wurden bei 180°C für 3 Stunden sterilisiert.

#### Zellkulturbedingungen für HepG2 und Huh7

Die Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Huh7 wurden in T75cm<sup>2</sup> bzw. T175cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen in Medium III kultiviert und alle 3-5 Tage durch Inkubation mit 1x Trypsin/EDTA für 5min im Brutschrank gesplittet. Durch Zentrifugation (5min, 1200U/min, 4°C) und Waschen der Zellen erreichte man eine komplette Beseitigung des Trypsins.

#### Zellkulturbedingungen für PHH

Die Kultivierung von PHH erfolgte stets in beschichteten 12well Zellkulturplatten, die dazu mit 0,2mg/ml Collagen Typ I für 1h bei 37°C oder über Nacht bei RT inkubiert wurden.

Anschließend wurden die Platten zweifach mit PBS gewaschen, getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C steril gelagert. Die isolierten PHH wurden zunächst vorsichtig in Medium I aufgenommen, je  $1 \times 10^5$  Zellen in die beschichteten 12well Platten ausgesät und für mindestens 4h bis zur Adhäsion der Zellen kultiviert. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift der adhärenen Zellen mit warmem PBS, gefolgt von einer 24 stündigen Kultivierung der Zellen mit FKS- und Dexamethason freiem Medium (Medium II). Anschließend wurden die Zellen mit den apoptotischen Stimuli inkubiert.

### **Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zahl der lebendigen Zellen wurde der Trypan-Ausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus, während tote Zellen blau gefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

### **Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen**

Um die Expression von Oberflächenmolekülen zu quantifizieren und die Anteile von positiven Zellen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Messungen (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS) durchgeführt. Für die Färbung des EGF-Rezeptors auf den Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Huh7 sowie PHH wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 96well Zellkulturplatten pipettiert und durch Zentrifugation (5min, 1200U/min, 4°C) pelletiert. Die Zellen wurden mit dem PE-konjugierten anti-EGFR Antikörper in passender Verdünnung in 100µl PBS mit 2% FCS (FACS-Puffer) für 30min bei RT inkubiert. Es wurde stets eine Negativkontrolle, d.h. ungefärbte Zellen, durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS Calibur gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software DIVA (BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet.

### **Inkubationsbedingungen für humanes, intaktes, gesundes und HCC- Lebergewebe**

Das Primärmaterial, d.h. humanes, intaktes, gesundes und HCC-Lebergewebe, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Lehner (Institut für Viszeralmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) post-OP zur Verfügung gestellt. Durch histologische Begutachtung durch Dr.

Florian Länger (Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover) wurde das Primärmaterial charakterisiert. Alle Arbeiten mit Lebergewebe wurden nach Protokoll des etablierten *ex vivo* Modells durchgeführt (Volkmann et al., 2007). Demnach wurde das Gewebe in isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung in 125mm<sup>3</sup> Stücke geschnitten und anschließend in 24well Zellkulturplatten mit Medium III bedeckt. Die Inkubation mit apoptotischen Stimuli erfolgte sofort.

### **Fusionskonstrukte scTRAIL und. αEGFR-scTRAIL**

Die Fusionskonstrukte scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL wurden im Labor von Prof. Dr. Pfizenmaier (Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart) generiert und zur Verfügung gestellt (Dissertation Britta Schneider).

### **Apoptose-Induktion durch Bortezomib und/oder scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL von Zellen oder Gewebe**

Alle Versuche mit den verschiedenen apoptotischen Stimuli wurden in 1ml des entsprechenden Mediums durchgeführt. Die Vorbehandlung der Zellen und des Gewebes erfolgte mit 500ng/ml Bortezomib (MW= 384,24g/mol) und dauerte 2 Stunden, gefolgt von einer 6 stündigen Inkubation ohne oder mit den jeweiligen TRAIL-Proteinen scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL (100ng/ml). Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen oder Gewebe über einen Zeitraum von 8 Stunden mitgeführt. Für die Inhibitionsversuche mit neutralisierenden TRAIL-Antikörper (1µg/ml) oder pan-Caspase-Inhibitor (10µM, QVAD) wurden Huh7 Zellen 1h vor Bortezomib-Zugabe bzw. 3h vor der Behandlung mit den verschiedenen TRAIL-Versionen behandelt. Als Positivkontrolle wurden PHH für 6h mit 100ng/ml Flag-tagged CD95L und 1µg/ml anti-Flag M2 Antikörper inkubiert. Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen mittels Zellschaber im Medium gelöst, durch Zentrifugation (5min, 13000U/min, 4°C) pelletiert und bei -20°C gelagert. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### **Kristallviolett-Färbung**

Der Farbstoff Kristallviolett akkumuliert im Zellkern und ist somit ein Maß für die Lebend-Zellzahl in einer Population. Je  $2,5 \times 10^4$  Zellen (PHH und Huh7) wurden in 100µl Medium in Mehrfachansätzen in 96well Zellkulturplatten (flat bottom) ausgesät und ü.N. kultiviert.

Anschließend erfolgten die Apoptose-Induktionsversuche. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 1% Glutaraldehyd für 20min bei RT fixiert und anschließend mit 200µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit je 100µl 0,02% Kristallviolett, gelöst in 10% Ethanol, für 30min bei RT gefärbt und folgend zweimal mit je 200µl A. bidest gewaschen. Zur Solubilisierung des Farbstoffes wurden die Zellen mit je 200µl 70% Ethanol für 1-2h inkubiert und anschließend die Absorbtion am Mikroplatten-Reader bei 590nm gemessen. Als Kontrolle (100% lebende Zellen) wurden unbehandelte Zellen und als Blank Medium verwendet.

## **Molekularbiologische Arbeiten**

### **Isolierung von Gesamt-RNA**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Lebergewebe wurden 1-2mg des Gewebes in 1ml Trizol aufgenommen und mit Mörser und Pistill homogenisiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform und gründlichem Vortexen erfolgte eine Zentrifugation von 15min bei 10000rpm (4°C). Anschließend wurde die wässrige Phase mit 500µl 70% Ethanol versetzt und die Gesamt-RNA mittels RNeasy Kit nach Herstellerangaben isoliert. Um eventuelle Reste an DNA nach der RNA-Isolation zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt.

### **cDNA-Synthese durch Reverse Transkription**

Bei der Reversen Transkription wird die isolierte RNA mit Hilfe einer DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in komplementär einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Umschreiben der präparierten RNA (100ng mRNA) in cDNA erfolge nach Herstellerprotokoll unter Verwendung des Enzyms Transcriptor Reverse Transkriptase und Random Hexamer Primern. Die enthaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion dient dem Nachweis bzw. der enzymatischen Amplifikation von DNA-Segmenten (Saiki et al., 1988). Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2ml Eppendorf-Safelock-Gefäßen angesetzt. Ein 20µl Einfachansatz enthielt:

2µl Desoxyribonukleotid-Gemisch (2mM)  
2µl cDNA  
2µl Primer-Gemisch (forward und reverse, 10µM)  
2µl 10x PCR-Reaktionspuffer  
1µl Red Taq Polymerase  
ad 20µl A. bidest

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Template mitgeführt. Die Proben wurden in einen Thermocycler überführt und folgendes Temperatur-Programm verwendet:

Denaturierung: 5min	95°C
30 Zyklen à : 30sec	95°C
45sec	60°C
4min	72°C
Elongation: 2min	72°C

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### **Gelelektrophorese**

DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe können mittels Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld getrennt werden. Dazu wurden jeweils 10µl des PCR Ansatzes mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt, auf ein 1% Agarose-Gel geladen und für 30-60min bei 100V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker (1kb) mit aufgetragen. Zur Visualisierung der DNA-PCR-Produkte wurden die Agarose-Gele mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2µg/ml) versetzt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Agarose-Gele im UV-Licht unter Verwendung eines Rotfilters fotografiert.

### **RT-PCR mit SYBR-Green**

Als Detektionssystem für die quantitative Real-Time PCR wurde SYBR-Green verwendet. Als Referenzgen diente GAPDH. Alle PCR-Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt. Ein Ansatz für eine PCR-Reaktion enthielt:

1µl QuantiTec Primer Assay  
5µl SYBR-GreenER SuperMix  
0,25µl ROX Reference Dye  
1µl Template (cDNA aus 100ng RNA)  
ad 10µl A. bidest

Nach Mischen aller Reaktionskomponenten wurden die Ansätze in eine 96well Platte übertragen und mit einer Folie versiegelt. Alle RT-PCR Läufe wurden im Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System durchgeführt und liefen nach folgendem Programm ab:

2min 50°C  
10min 95°C  
45 Zyklen à: 15sec 95°C  
60sec 57°C  
60sec 72°C

Mittels *deltadealta* Ct-Methode, unter Einbeziehung des Referenzgens GAPDH, wurden die Unterschiede in der Expression der Zielgene in den unbehandelten und behandelten Proben von gesundem und HCC-Lebergewebe berechnet (Ratio).

## **Proteinbiochemische Arbeiten**

### **Präparation von Gesamtzellextrakten**

Alle Arbeiten zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden auf Eis durchgeführt. Die Gesamtzellextrakte aus PHH und Huh7 wurden aus den bei -20°C gelagerten Zellpellets gewonnen, wobei diese zunächst mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation (5min, 13000U/min, 4°C) pelletiert wurden. Nach Zugabe von 100µl Lysispuffer, mit anschließender Inkubation für mind. 30min, wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10min, 10000U/min, 4°C) von den Lysaten getrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Auftauen der Proteinlösung wurde das Zellextrakt für 5min zentrifugiert (13000U/min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **Präparation von Proteinextrakten aus Lebergewebe**

Alle Arbeitsschritte zur Gewinnung von Proteinextrakten wurden auf Eis durchgeführt. Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Gewebe wurde mit Hilfe eines Homogenisators pulverisiert und anschließend mit  $150\mu\text{l}$  Lysispuffer versetzt und für mind. 30min inkubiert. Das Proteinlysate wurde durch Zentrifugation (10min,  $10000\text{U}/\text{min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) von den Zelltrümmern separiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Proteinbestimmung durch BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay**

Mit Hilfe des BCA Protein Assay kann die Konzentration von Proteinen in Lösungen bestimmt werden. Das Prinzip des Assays beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  (Biuret-Reaktion) im alkalischen Medium durch Proteine, wobei die enthaltene Bicinchoninsäure mit  $\text{Cu}^{1+}$  einen lilafarbenen Komplex bildet, der bei einer Wellenlänge von  $562\text{nm}$  eine messbare Absorption aufweist. Mit Hilfe einer BSA Eichgerade im Bereich von  $25\mu\text{g}/\text{ml}$  bis  $2000\mu\text{g}/\text{ml}$  kann die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt werden. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proteinextrakte aus Zellen oder Gewebe wurden je  $10\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit  $200\mu\text{l}$  des BCA-Reagentgemisch (50:1 BCA Reagent A und BCA Reagent B) in einer 96well Zellkulturplatte (flat bottom) gemischt und für 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Als Referenz (Blank) wurde Proteinpuffer als Probe eingesetzt. Anschließend wurde die Absorption bei  $562\text{nm}$  am Mikroplatten-Reader gemessen. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

### **Proteinquantifizierung**

Die Quantifizierung der Protein erfolgte mittels Western Blot, die mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop ausgewertet wurden.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Unter Verwendung der diskontinuierlichen SDS-PAGE können Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Es wurden  $50\mu\text{g}$  Protein mit Proteinprobenpuffer (4x) versetzt, 5min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend auf ein 12%iges Acrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer für 15min bei 90V und für mind. 60min bei 110V durchgeführt. Als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichtes diente der Precision Plus Protein Dual Color.

## Western Blot

Beim Western Blot erfolgt nach der Auftrennung der Protein entsprechend ihres Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE der Transfer der Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran mit anschließender Detektion des gewünschten Zielproteins durch spezifische Antikörper.

Das Blotting der Gele erfolgte nach dem Semi-Dry-Verfahren für 30min pro Membran mit einer Spannung von  $1,2\text{mA}/\text{cm}^2$  (max. 350mA, 100V). Anschließend wurde die Membran für mindestens 1h in Blockingpuffer geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper erfolgte stets ü.N. in Blockingpuffer, gefolgt von 3x15min Waschen in Waschpuffer. Die Membranen wurden 1 Stunde mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert, 3x15min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mittels ECL-System die gebundenen Peroxidase-Moleküle detektiert. Nach kurzer Exposition eines Chemolumineszenzfilms erfolgte die Entwicklung des Films in einem automatischen Entwickler.

Zur weiteren Verwendung der Membran wurde diese einem Stripping-Protokoll unterzogen. Nach 2x5min Waschen mit A. bidest, einer 10min Inkubation mit Stripping-Puffer und erneutem Waschen mit A. bidest, wurde die Membran für mindestens 1 Stunde mit Blockingpuffer geblockt. Anschließend erfolgte entweder eine erneute Detektion des gewünschten Zielproteins mit Hilfe spezifischer Antikörper oder die Lagerung der Membran zwischen 2 Whatman-Papieren bis zur erneuten Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Caspase-Glo 3/7 Assay

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde die Caspasen-Aktivität mittels Caspase-Glo 3/7 Assay in den Proteinlysaten der Zellen oder des Gewebes ermittelt. Der Assay besteht aus dem Caspase Substrat DEVD-Aminoluciferin und einer hitzebeständigen Luciferase. Nach Caspase-3/7 spezifischer Spaltung des Substrates wird ungebundenes Aminoluciferin freigesetzt und von der Luciferase in ein Lumineszenzsignal umgesetzt (Abb.6).



U/min) inkubiert und anschließend 5x mit je 250µl Waschpuffer gewaschen. Nach 20 minütiger Inkubation im Dunkeln mit 200µl TMB-Substrat und Abstoppen der Reaktion mit 50µl Stop-Lösung wurde die Absorption bei 450nm am Mikroplatten-Reader gemessen. Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte nach kubischer Spline.

## **Immunhistochemische Arbeiten**

### **Anfertigung von Kryo-Gewebeschnitten**

Um bestimmte Organstrukturen bzw. die Lokalisierung bestimmter Zelltypen und Proteine im Gewebe zu untersuchen, bedient man sich der Herstellung und Anfärbung von Gewebeschnitten. Gefrierschnitte (Kryoschnitte) eignen sich sehr gut für immunhistologische Färbungen, da ein Großteil der Antikörper-Epitope durch spezielle Schnitt- und Fixierungsbedingungen sowie Lagerung bei -20°C erhalten bleiben. In dieser Arbeit wurde nach Behandlung des humanen, intakten gesunden bzw. HCC-Lebergewebe mit den verschiedenen Agenzien ein Stück der Leber in Einfriermedium in ein Einbetttschälchen überführt und bei -20°C gelagert. Mittels Kryostat wurden 10µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf einen Superfrost Objektträger transferiert und anschließend getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese bei -20°C gelagert.

### **Aminoethylcarbazol (AEC) Färbung**

In dieser Arbeit wurde als immunhistochemische Nachweismethode die ABC-Technik verwendet, bei der die spezifische Bindung eines Primärantikörpers an das gesuchte Zielantigen mittels biotinylierten Sekundärantikörper und Avidin-Peroxidase-Komplex sichtbar gemacht wird. Die 10µm dicken Gewebeschnitte wurden zunächst für 30min bei Raumtemperatur angetaut und anschließend für 1min in kaltem Aceton fixiert. Für alle Waschschrte wurde isotoner TRIS-HCl (pH 7,4) Puffer verwendet. Nach Blocken der endogenen Peroxidase durch Inkubation der Gewebeschnitte in 197ml Methanol und 3ml 30%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10min, erfolgten 2 Waschschrte in A. dest.. Alle nun folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Blocklösung wurde 1%ige BSA /TRIS-HCL Lösung mit 1 Tropfen Horse-Serum versetzt und die Schnitte für mindestens 1h bei RT inkubiert. Die Primärantikörper wurden in 1% BSA/TRIS verdünnt und die Schnitte mit je 50µl bedeckt und ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TRIS-HCl wurden die Schnitte für 30min bei RT mit je 50µl der Sekundär-Antikörper-Lösung, bestehend aus 5ml TRIS-HCl mit je 2 Tropfen Pferdeserum und biotinylierten Sekundär-Antikörper aus dem

Vectastain-Elite-ABC-Kit inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit TRIS-HCL gewaschen und für 60min bei RT mit 50µl der ABC-Lösung, zusammengesetzt aus 5ml TRIS-Puffer versetzt mit 2 Tropfen Avidin und 2 Tropfen Biotin, bedeckt. Für die folgende Farbreaktion wurden die Schnitte zunächst zweimalig in TRIS-Puffer gewaschen und anschließend mit 50µl der 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Lösung aus dem AEC-Substrat-Kit bedeckt. Nach Auftreten des rosa Farbumschlages wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen der Schnitte in A. dest. abgestoppt. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun und das Eindecken der Schnitte mit Aqua Mounting Medium. Anschließend wurden mikroskopische Aufnahmen der gefärbten Gewebeschnitten am Mikroskop in 200x und 400x Vergrößerung gemacht und mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop ausgewertet.

### **TUNEL-Färbung (TdT-vermittelte dUTP *nick end labeling*)**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Objektträger mit den Gefrierschnitten zunächst aufgetaut und anschließend für 1min in kaltem Aceton fixiert. Alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Gewebsschnitte mit 0,1% Natriumacetat und 0,1% Triton-X in PBS für 30min bei RT permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Gewebsschnitte für 1h bei 37°C mit je 40µl TUNEL-Reagenz (1:20 Enzym mit Puffer verdünnt) inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI für 2min angefärbt. Nach einem abschließenden Waschschrift erfolgte die Einbettung der Immunfluoreszenz-gefärbten Gefrierschnitte mit Mowiol.

### **Software**

Als Software-Programme wurden Graph Pad Prism 5.0 für Windows (Graph Pad Software, San Diego, USA) und Adobe Photoshop CS2 Version 9.0 (Adobe Systems GmbH, München) verwendet.

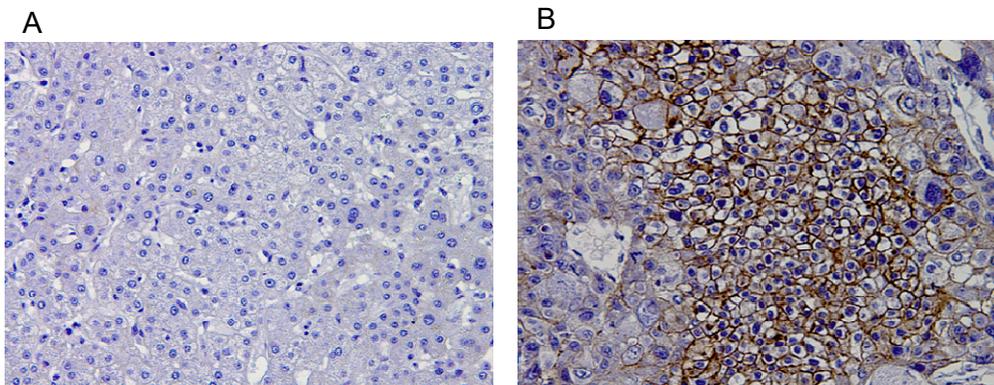
### **Statistik**

Für die Erstellung der Graphen und zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism verwendet. Alle Werte sind als Mean±SEM angegeben. Für die statistische Analyse der Daten wurden der Mann-Whitney Test bzw. der unpaired t-Test verwendet. Die Signifikanzen sind nach folgendem System angegeben: \*\*p<0,01 hoch signifikant, \*p<0,05 signifikant und n.s. nicht signifikant.

## C ERGEBNISSE

### Nachweis der EGF-Rezeptor Expression

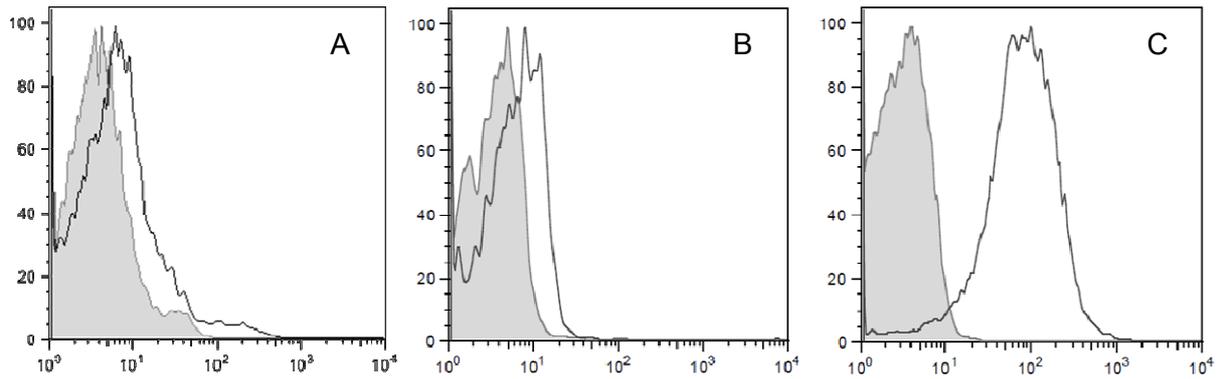
In ca. 70 % aller HCC-Lebergewebe ist der EGF-Rezeptor überexprimiert. Um das Vorhandensein des EGF-Rezeptors in humanem Lebergewebe zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen auf Paraffin-Gewebeschnitten von gesundem und HCC-Lebergewebe vom Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, in Kooperation mit Dr. Krech, angefertigt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden in unserem Labor mikroskopisch mit einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.



**Abb.7: EGF-Rezeptor Färbung auf gesundem und HCC-Lebergewebe.** Hochregulierung des EGF-Rezeptors in HCC-Lebergewebe (B) im Vergleich zu gesundem (A) Lebergewebe (200-fache Vergrößerung). Das Lebergewebe wurde mit Hilfe eines monoklonalen EGF-Rezeptor Antikörpers gefärbt. In gesundem Lebergewebe sind kaum Farbreaktionen detektierbar, während HCC-Lebergewebe eine positive Membranfärbung für EGF-Rezeptor aufweist.

In allen untersuchten HCC-Gewebeschnitten war eine spezifische membranständige EGF-Rezeptor Färbung der Karzinomzellen zu verzeichnen (Abb.7B). Gesundes Lebergewebe zeigten dagegen kaum EGF-Rezeptor Färbung (Abb.7A).

In Ergänzung zur EGF-Rezeptor Färbung auf HCC-Lebergewebe wurden zwei verschiedene Hepatoma-Zelllinien (HepG2 und Huh7) und primäre humane Hepatozyten (PHH) auf ihre EGF-Rezeptor Expression durchflusszytometrisch untersucht.

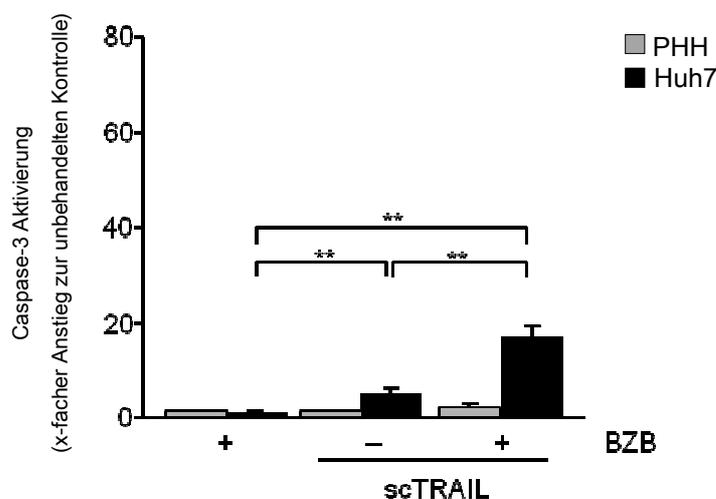


**Abb.8: Durchflusszytometrische Analyse der Hepatoma-Zelllinien und PHH auf EGF-Rezeptor Expression.** Dargestellt ist die Negativkontrolle (grau) und die mit PE-konjugiertem EGF-Rezeptor Antikörper gefärbten Zellen PHH (A), HepG2 (B) und Huh7 (C).

Die Hepatoma-Zelllinie Huh7 (Abb.8C) weist eine höhere EGF-Rezeptor Expression im Vergleich zu HepG2 auf (Abb.8B) und wurde deshalb für alle *in vitro* Experimente als EGFR<sup>+</sup> Hepatoma-Zelllinie verwendet. PHH exprimieren kaum EGF-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche (Abb.8A).

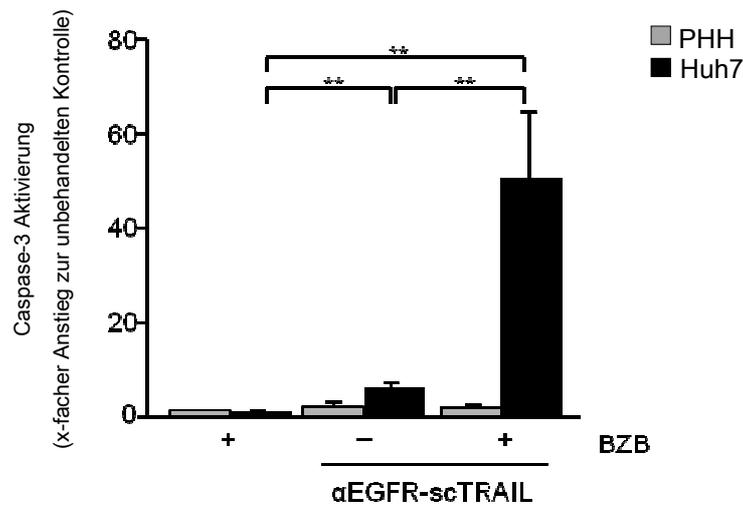
### Zelltod-Induktion durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in Huh7 und PHH

Zunächst wurden die Zelltod-Effekte von scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL allein oder in Kombination mit Bortezomib (BZB) in Huh7 (n=6) und PHH (n=6) untersucht. Nach Apoptose-Induktion mit den verschiedenen Stimuli wurde die Caspasen-Aktivierung mittels luminometrischen Substrattests analysiert.



**Abb.9: Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in PHH und Huh7.** Relative Caspasen-Aktivität in PHH (grau, n=6) und Huh7 (schwarz, n =6) nach Apoptose-Induktion mit Bortezomib, scTRAIL allein bzw. in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. \*\*p<0,01 hoch signifikant

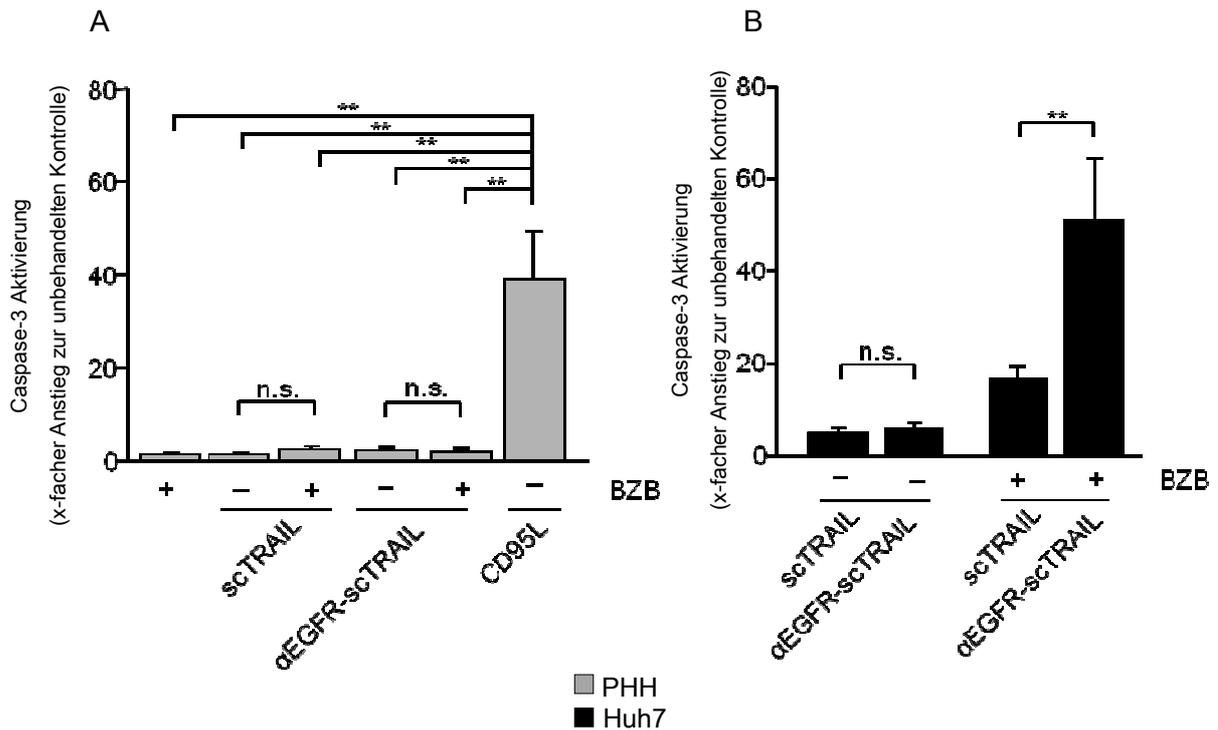
Die erhaltenen Werte (*relative light units*), nach der Behandlung mit Bortezomib sowie scTRAIL bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL allein oder in Kombination mit Bortezomib, wurden ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt, um so den x-fachen Anstieg der Caspasen-Aktivierung nach Stimulation zu erhalten. Verglichen zur alleinigen Bortezomib-Behandlung der Huh7 Zellen, die eine marginale Caspase-3 Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle induziert ( $1,2 \pm 0,3$  Anstieg), führte das scTRAIL zu einem signifikanten Anstieg der Caspase-3 Aktivität ( $5,2 \pm 1,0$  Anstieg,  $p < 0,01$ ), die durch Zugabe von Bortezomib weiter signifikant gesteigert werden konnte ( $17,1 \pm 2,3$  Anstieg,  $p < 0,01$ ). Im Gegensatz zu den Hepatoma-Zellen Huh7 wurde in PHH weder durch Bortezomib oder scTRAIL allein noch in Kombination ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Caspasen-Aktivierung erzielt ( $1,4 \pm 0,2$ ;  $1,4 \pm 0,2$  und  $2,4 \pm 0,7$  Anstieg, Abb. 9). Auch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL induzierte in Huh7 eine signifikant erhöhte Caspasen-Aktivität verglichen zur unbehandelten Kontrolle ( $6,2 \pm 1,1$  Anstieg;  $p < 0,01$ ), die durch die kombinierte Behandlung mit Bortezomib signifikant gesteigert werden konnte ( $50,6 \pm 14,0$  Anstieg;  $p < 0,01$ ). Weder allein ( $2,2 \pm 0,8$  Anstieg) noch kombiniert mit Bortezomib führte  $\alpha$ EGFR-scTRAIL ( $1,9 \pm 0,8$  Anstieg) in PHH zur Caspasen-Aktivierung (Abb.10).



**Abb.10: Caspasen-Aktivierung durch αEGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in PHH und Huh7.** Relative Caspasen-Aktivität in PHH (grau, n=6) und Huh7 (schwarz, n=6) nach Apoptose-Induktion mit Bortezomib, αEGFR-TRAIL alleine bzw. in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. \*\*p<0,01 hoch signifikant

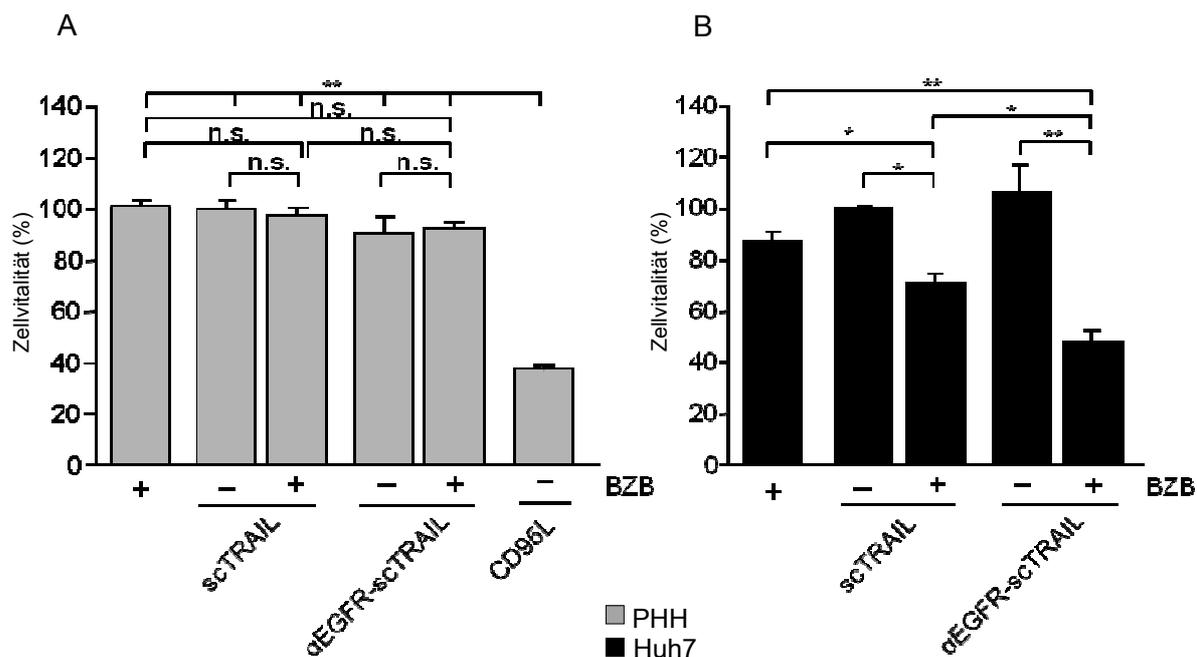
**Caspasen-Aktivierung und Zelltod durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in Huh7 und PHH**

Weder scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine noch kombiniert mit Bortezomib lösten in PHH einen signifikanten Anstieg der Caspasen-Aktivierung aus und bewirken somit keine toxischen Effekte in normalen Leberzellen (Abb.11A). Als Positivkontrolle wurden PHH mit CD95L behandelt, wodurch ein signifikanter Anstieg der Caspasen-Aktivierung (38,9±10,5) im Vergleich zu den verschiedenen TRAIL-Versionen alleine oder mit Bortezomib erzielt wurde (p<0,01).



**Abb.11: Vergleich der Caspasen-Aktivierung induziert durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib.** Relative Caspasen-Aktivität von PHH (A, n=6) bzw. Huh7 (B, n=6) nach Apoptose-Induktion mit Bortezomib, scTRAIL bzw. αEGFR-TRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Als Positivkontrolle wurden PHH mit CD95L behandelt. \*\*p< 0,01 hoch signifikant; n.s. nicht signifikant

Mittels Kristallviolett-Färbung wurde der prozentuale Anteil an lebenden Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Substanzen, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%), in Huh7 und PHH analysiert (Abb.12).

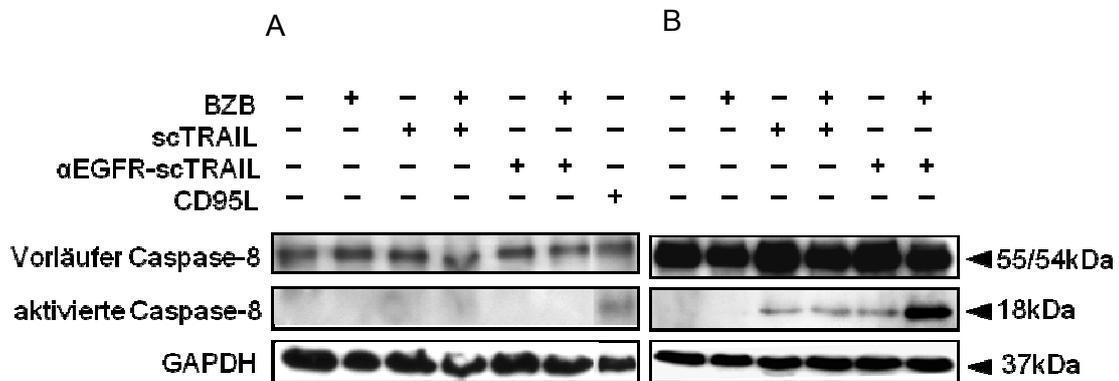


**Abb.12: Kristallviolett-Färbung durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL mit und ohne Bortezomib von PHH und Huh7.** Zur Bestimmung der Zellvitalität nach Stimulation mit Bortezomib, scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL sowie deren Kombination mit Bortezomib wurden PHH (A, n=5) und Huh7 (B, n=5) mit Kristallviolett gefärbt. Angegeben ist der prozentuale Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%). \*\*p<0,01 hoch signifikant; n.s. nicht signifikant

In PHH wurde durch die verschiedenen TRAIL-Versionen alleine und in Kombination mit Bortezomib keine signifikante Reduktion der Lebendzellzahl hervorgerufen (BZB 100,7±3,1%; scTRAIL 99,3±4,3%; αEGFR-scTRAIL 90,1±6,7%; scTRAIL+BZB 96,8±4,0%; αEGFR-scTRAIL+BZB 92,4±2,6%; Abb.12A). Durch die Behandlung der Zellen mit CD95L (37,1±2,0%; p<0,01) wurde im Vergleich zu den verschiedenen Stimuli die Lebendzellzahl signifikant vermindert. Im Gegensatz dazu führte das scTRAIL mit Bortezomib (70,9±2,8%; p<0,05) zu einem signifikanten bzw. das αEGFR-scTRAIL mit Bortezomib (47,7±4,1%) zu einem hoch signifikanten Abfall der Vitalität von Huh7 Zellen im Vergleich zu den Konstrukten allein (100,1±0,5% und 105,8±10,9%; p<0,01). Durch die Sensitivierung mit Bortezomib und anschließender Zugabe von αEGFR-scTRAIL konnte der prozentuale Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zu Bortezomib alleine (86,6±3,9%) hoch signifikant vermindert werden (Abb.12B; p<0,01). Im Vergleich zu scTRAIL mit Bortezomib konnte durch αEGFR-scTRAIL mit Bortezomib eine signifikant stärkere Reduktion der Vitalität in Huh7 induziert werden (p<0,05; Abb.12B).

**Nachweis der TRAIL-induzierten Effektor- und Initiatorcaspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in Huh7 und PHH**

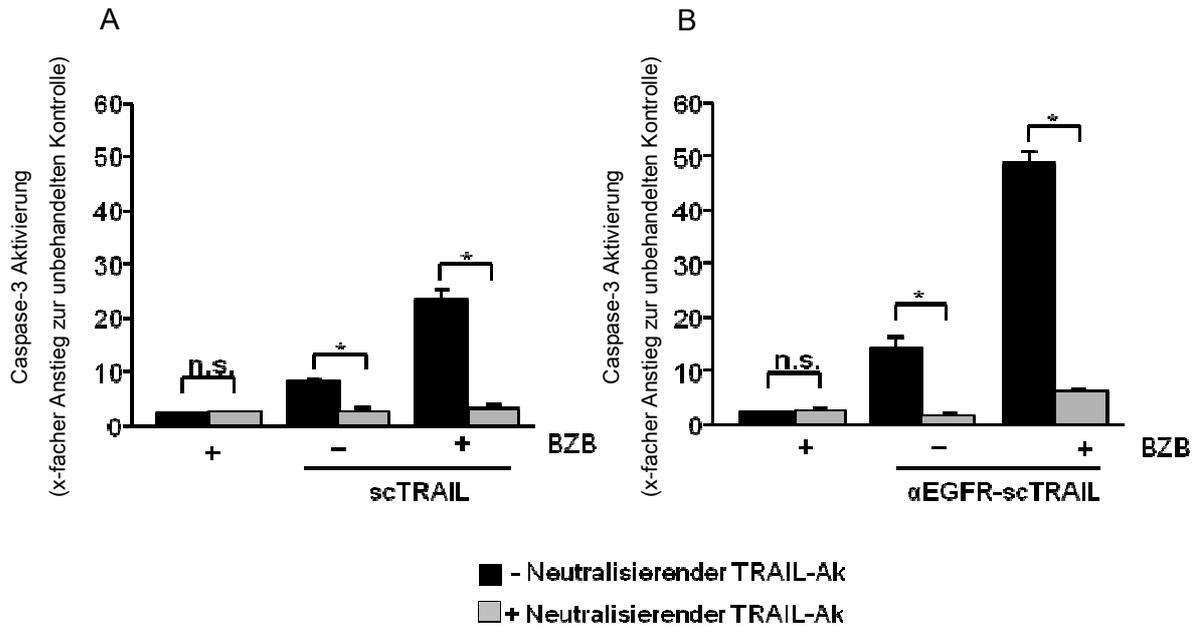
In Ergänzung zur luminometrischen Caspase-Aktivitätsbestimmung wurden Western Blot Analysen für die TRAIL-induzierte Aktivierung von Initiatorcaspase-8 von PHH und Huh7 vorgenommen (Abb.13). In PHH konnte weder durch Bortezomib, scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine noch in Kombination aktivierte Caspase-8 (18kDa) nachgewiesen werden (Abb.13A). Im Vergleich zu den Hepatoma-Zellen weisen PHH weniger inaktive Caspase-8 (55/54kDa) auf (Abb.13B). Als Positivkontrolle wurden PHH mit CD95L stimuliert. Dadurch konnte aktivierte Caspase-8, bei gleicher Expression der Vorläufer Caspase-8, detektiert werden.



**Abb.13: Western Blot Analyse.** Nachweis von Initiatorcaspase-8 (55/54 und 18kDa) im Proteinlysate von PHH (A) und Huh7 (B) behandelt mit scTRAIL bzw. αEGFR-TRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib. Als Positivkontrolle wurden PHH mit CD95L behandelt. Als Kontrolle diente GAPDH.

Im Gegensatz zu den PHH konnte in Huh7 nach Stimulation mit den Konstrukten scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine und verstärkt in Kombination mit Bortezomib aktivierte Caspase-8 (18kDa) nachgewiesen werden (Abb.13B). Im Vergleich zu scTRAIL mit Bortezomib konnte durch αEGFR-scTRAIL mit Bortezomib eine stärkere Aktivierung der Caspase-8 erzielt werden.

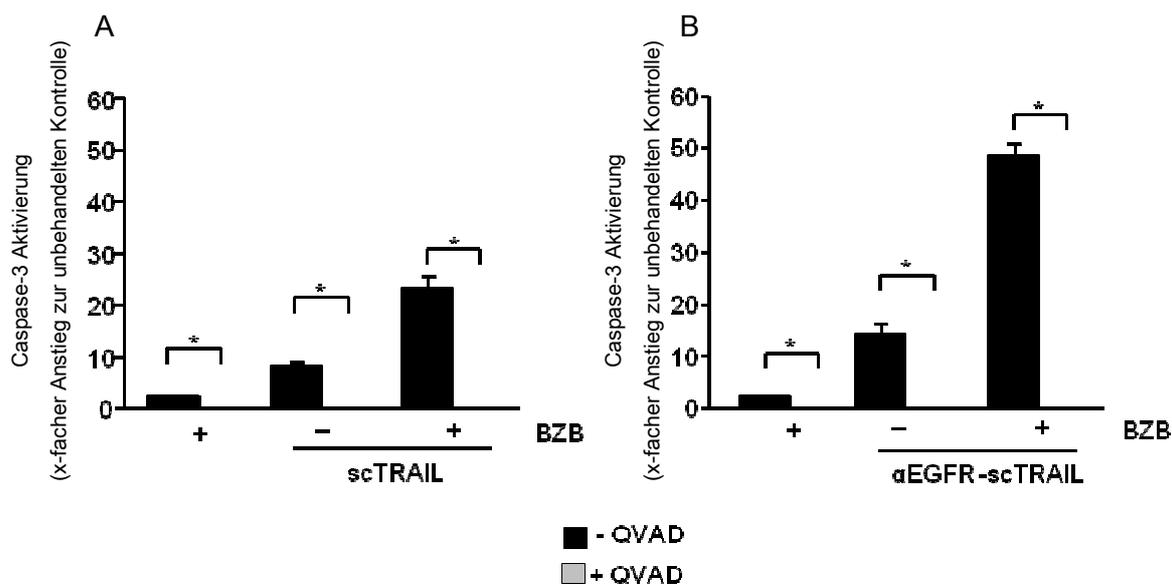
Um die TRAIL-Rezeptor vermittelte Caspase-Aktivierung zu verifizieren, wurden Huh7 Zellen mit einem neutralisierenden TRAIL-Antikörper (Ak; Abb.14) bzw. mit einem pan-Caspase-Inhibitor (QVAD; Abb.15) vorinkubiert.



**Abb.14: Inhibierung der Caspasen-Aktivität durch neutralisierenden TRAIL-Antikörper in Huh7.** Luminometrischer Nachweis der Caspasen-Aktivierung in Huh7 Zellen (n=4), die mit scTRAIL (A) bzw. alphaEGFR-scTRAIL (B) alleine oder in Kombination mit Bortezomib jeweils mit (grau) und ohne (schwarz) Zusatz des neutralisierenden TRAIL-Antikörper behandelt wurden. Keine Inhibierung der Caspasen-Aktivierung findet in Huh7 Zellen statt, die nur mit Bortezomib behandelt wurden. \* p<0,05 signifikant; n.s. nicht-signifikant

Dabei zeigte die Zugabe des neutralisierenden TRAIL-Antikörpers (Ak) keinen Effekt auf die Caspasen-Aktivierung in Huh7, die mit Bortezomib alleine behandelt wurden ( $2,5 \pm 0,1$  Anstieg [-Ak] und  $2,7 \pm 0,2$  Anstieg [+Ak]; Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Die Vorbehandlung mit dem neutralisierenden TRAIL-Ak konnte dagegen die Caspasen-Aktivierung in Huh7 Zellen, induziert durch scTRAIL alleine ( $8,3 \pm 0,6$  Anstieg [-Ak] und  $2,8 \pm 0,6$  Anstieg [+Ak]) oder in Kombination mit Bortezomib ( $23,4 \pm 2,1$  Anstieg [-Ak] und  $3,3 \pm 0,7$  Anstieg [+Ak]) signifikant inhibieren (Abb.14A;  $p < 0,05$ ). Entsprechend wurde durch den neutralisierenden TRAIL-Ak die Caspasen-Aktivität in Huh7 Zellen, die mit alphaEGFR-scTRAIL alleine ( $14,3 \pm 1,9$  Anstieg [-Ak] und  $1,8 \pm 0,4$  Anstieg [+Ak]) oder in Kombination mit Bortezomib ( $48,7 \pm 2,3$  Anstieg [-Ak] und  $6,1 \pm 0,7$  Anstieg [+Ak]) behandelt wurden, signifikant reduziert (Abb.14B;  $p < 0,05$ ).

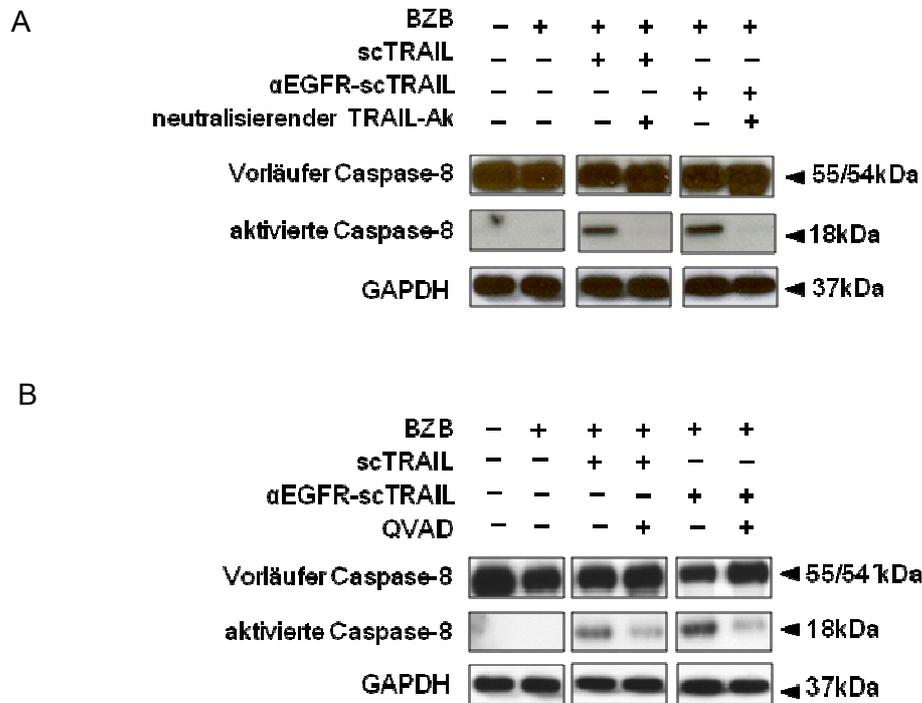
Die Vorbehandlung der Huh7 Zellen mit einem pan-Caspase-Inhibitor (QVAD) führte zu einer signifikant reduzierten Caspasen-Aktivierung induziert durch scTRAIL alleine ( $8,3 \pm 0,6$  Anstieg [-QVAD] und  $0,2 \pm 0,03$  Anstieg [+QVAD];  $p < 0,05$ ) oder durch scTRAIL in Kombination mit Bortezomib ( $23,4 \pm 2,1$  Anstieg [-QVAD] und  $0,1 \pm 0,02$  Anstieg [+QVAD]; Abb.15A).



**Abb.15: Inhibierung der Caspasen-Aktivität durch Pan-Caspase-Inhibitor (QVAD) in Huh7.** Luminometrischer Nachweis der Caspasen-Aktivierung in Huh7 Zellen ( $n=4$ ), die mit scTRAIL (A) bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL (B) alleine oder in Kombination mit Bortezomib jeweils mit (grau) bzw. ohne (schwarz) Zusatz des Caspase-Inhibitors QVAD behandelt wurden.  $*p < 0,05$  signifikant

Entsprechend wurde die Caspasen-Aktivität durch den Caspase-Inhibitor auch in Huh7 Zellen, die mit  $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine ( $14,3 \pm 1,9$  Anstieg [-QVAD] und  $0,2 \pm 0,04$  Anstieg [+QVAD]) oder in Kombination mit Bortezomib ( $48,7 \pm 2,3$  Anstieg [-QVAD] und  $0,1 \pm 0,01$  Anstieg [+QVAD]) behandelt wurden, inhibiert (Abb.15B;  $p < 0,05$ ). Ebenso wird die durch Bortezomib alleine hervorgerufene geringe Caspasen-Aktivierung durch eine Vorbehandlung mit QVAD signifikant reduziert ( $2,5 \pm 0,1$  Anstieg [-QVAD] und  $0,1 \pm 0,01$  Anstieg [+QVAD];  $p < 0,05$ ).

Ergänzend wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um den Einfluss des neutralisierenden TRAIL-Ak und des Caspase-Inhibitors QVAD auf die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 zu verifizieren.

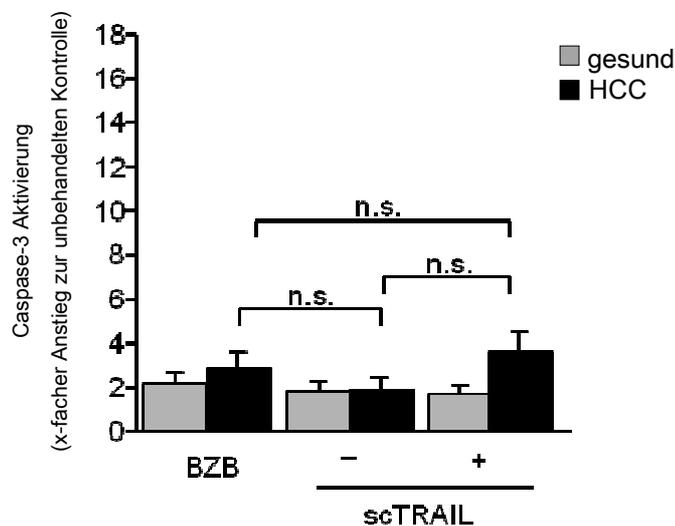


**Abb.16: Western Blot Analyse.** Nachweis von aktivierter Caspase-8 (18kDa) sowie Vorläufer Caspase-8 (55/54kDa) im Proteinlysate von Huh7 Zellen, die mit scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib jeweils mit und ohne Zusatz von neutralisierendem TRAIL-Ak (A) oder QVAD (B) behandelt wurden. Als Ladekontrolle dient GAPDH.

Durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem neutralisierenden TRAIL-Ak konnte die Caspase-8 Aktivierung, induziert durch die Behandlung mit scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL jeweils in Kombination mit Bortezomib, vollständig inhibiert werden (Abb.16A). Abbildung 16B zeigt, dass die in den Hepatoma-Zellen durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib induzierte Caspase-8 Aktivierung ebenfalls durch Vorbehandlung mit dem Caspase-Inhibitor (QVAD) blockiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die Caspasen-Aktivierung TRAIL-induziert und nicht auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist.

**Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib im gesunden und HCC-Lebergewebe**

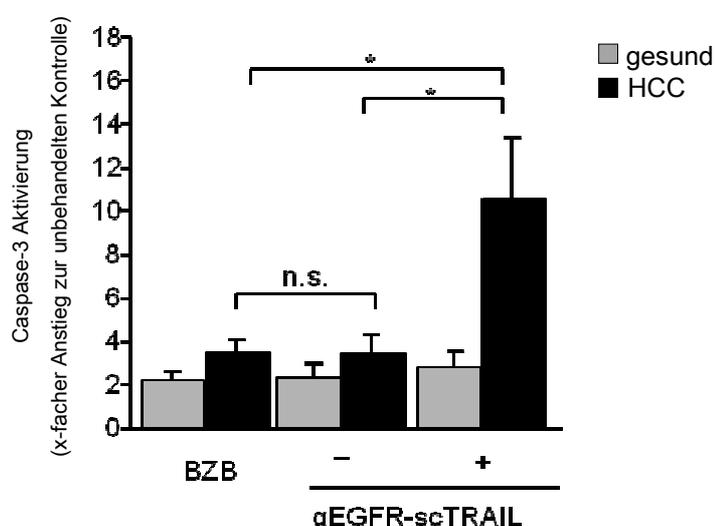
Mit Hilfe des 2007 im Labor etablierten *ex vivo* Models (Volkman et al., 2007) wurden die *in vitro* an PHH und Huh7 erzielten Ergebnisse erstmals im humanem, intaktem, unfixiertem Lebergewebe verifiziert. In Zusammenarbeit mit Dr. Frank Lehner vom Institut für Viszeralmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover wurde Primärmaterial nach Leberteileresektionen zur Verfügung gestellt. Durch histologische Begutachtung des Institutes für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover wurde das Primärmaterial charakterisiert und das histopathologische Grading des HCC-Lebergewebes bestimmt. Es wurde gesundes Lebergewebe (n=8; Alter 59,8±4,5; 62,5% männlich) vom Patienten mit partieller Hepatektomie aufgrund von Metastasen nicht-hepatischen Ursprungs und das Tumor-Lebergewebe von HCC Patienten (n=12; Alter 60,5±3,1; 58,3% männlich) mit kryptogener Leberzirrhose (n=6), HCV-Infektion (n=2), Hämochromatose (n=2), alkoholischer Lebererkrankung (n=1) und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD, n=1) analysiert. Zusätzlich wurde auch tumorfreies Gewebe von HCC-Patienten verwendet (n=5; Alter 58,5±4,1; 60,0% männlich).



**Abb.17: Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in gesundem und HCC-Lebergewebe.** Dargestellt sind der x-fache Anstieg der Caspase-Aktivität von humanem gesundem (grau, n=7) und HCC-Lebergewebe (schwarz, n=8) nach Apoptose-Induktion mit Bortezomib, scTRAIL alleine bzw. kombiniert mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. n.s. nicht signifikant

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Huh7 Zellen konnte im HCC-Gewebe durch scTRAIL in Kombination mit Bortezomib keine verstärkte Caspasen-Aktivität ( $3,6 \pm 0,9$  Anstieg;  $n=8$ ) im Vergleich zu scTRAIL ( $1,9 \pm 0,6$  Anstieg) oder Bortezomib alleine ( $2,9 \pm 0,7$  Anstieg) induziert werden (Abb.17).

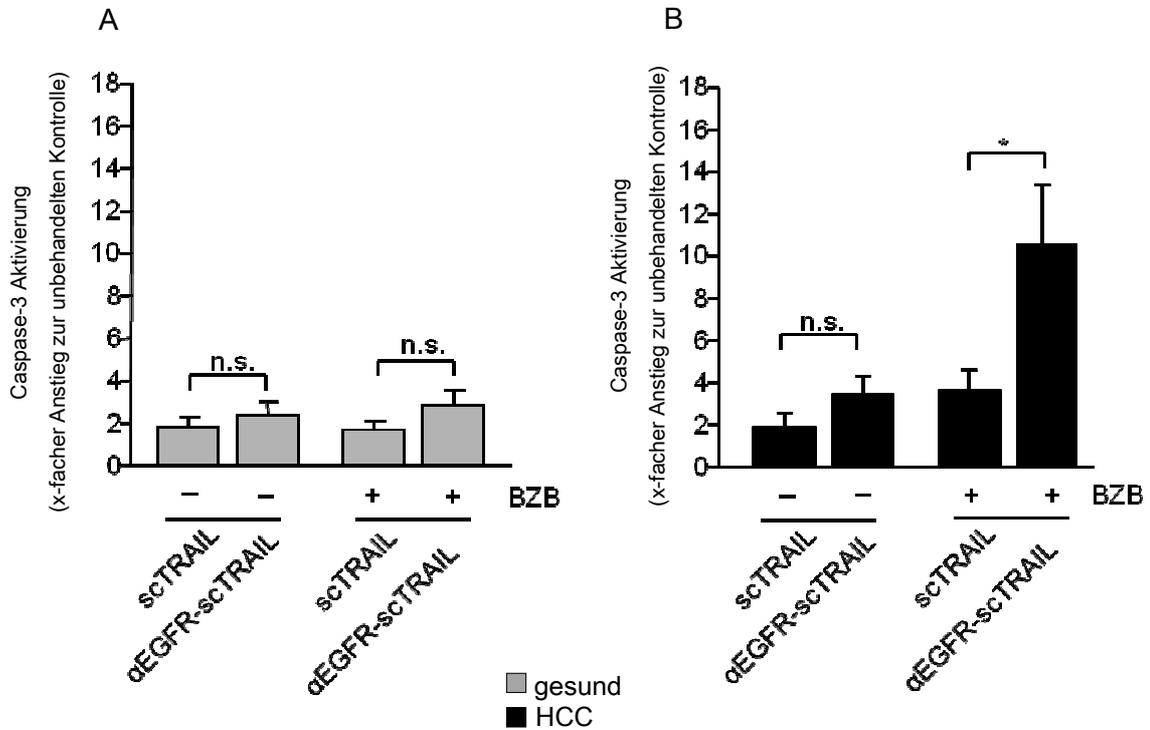
Dagegen wurde durch das  $\alpha$ EGFR-scTRAIL mit Bortezomib ( $10,6 \pm 2,8$  Anstieg;  $n=11$ ) im Vergleich zu  $\alpha$ EGFR-scTRAIL ( $3,5 \pm 0,9$  Anstieg) bzw. zu Bortezomib alleine ( $3,5 \pm 0,7$  Anstieg) ein signifikanter Anstieg der Caspasen-Aktivität ( $p < 0,05$ ) im HCC-Gewebe erzielt (Abb.18).



**Abb.18: Caspasen-Aktivierung durch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in gesundem und HCC-Lebergewebe.** Dargestellt ist der x-fache Anstieg der Caspasen-Aktivität von humanem gesundem (grau,  $n=7$ ) und HCC-Lebergewebe (schwarz,  $n=11$ ) nach Apoptose-Induktion mit Bortezomib,  $\alpha$ EGFR-scTRAIL allein bzw. kombiniert mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. \* $p < 0,05$  signifikant; n.s. nicht signifikant

Weder scTRAIL noch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine ( $1,8 \pm 0,5$  bzw.  $2,3 \pm 0,7$  Anstieg) oder in Kombination mit Bortezomib ( $1,7 \pm 0,4$  bzw.  $2,4 \pm 0,7$  Anstieg) führten im humanem gesundem Lebergewebe zur signifikanten Caspasen-Aktivierung (Abb.19A). Im Vergleich zum nicht tumorspezifischen TRAIL wird durch das tumorspezifische TRAIL in Kombination mit Bortezomib ( $2,2 \pm 0,4$  Anstieg) eine signifikant höhere Caspasen-Aktivierung im HCC-Gewebe induziert, während zwischen den verschiedenen TRAIL-Konstrukten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Caspasen-Aktivierung zu verzeichnen war (Abb.19B). Im

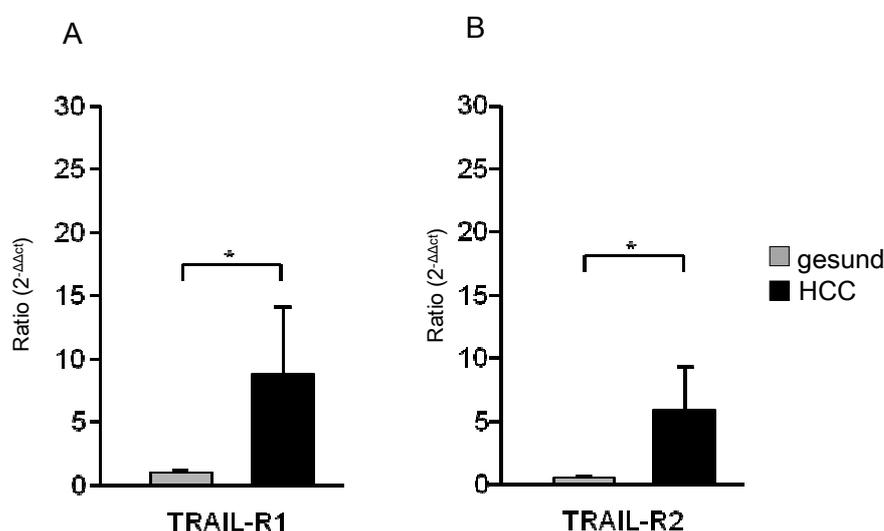
gesunden Lebergewebe zeigten weder die TRAIL-Konstrukte alleine noch in Kombination mit Bortezomib signifikante Effekte auf die Caspasen-Aktivierung (Abb.19A).



**Abb.19: Vergleich der Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in gesundem und HCC-Lebergewebe.** Relative Caspasen-Aktivität in gesundem (A) und HCC-Lebergewebe (B) nach Behandlung mit Bortezomib, scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine und in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. \*p < 0,05 signifikant; n.s. nicht signifikant

### TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Expression nach Bortezomib-Behandlung im gesunden und HCC-Lebergewebe

Um den Einfluss von Bortezomib auf HCC- und gesundes Lebergewebe hinsichtlich der Sensibilisierung gegenüber Apoptose-Induktion zu überprüfen, wurde die TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Expression im Bortezomib-behandelten HCC-Gewebe vergleichend zu gesundem Lebergewebe mittels RT-PCR quantitativ untersucht. Die Ergebnisse zeigen die relative Expression der Zielgene (TRAIL-R1/TRAIL-R2) des Bortezomib-behandelten gesunden oder HCC-Lebergewebes normiert auf das Referenzgen GAPDH (Ratio) im Vergleich zum unbehandelten Kontrollgewebe (Abb. 20).

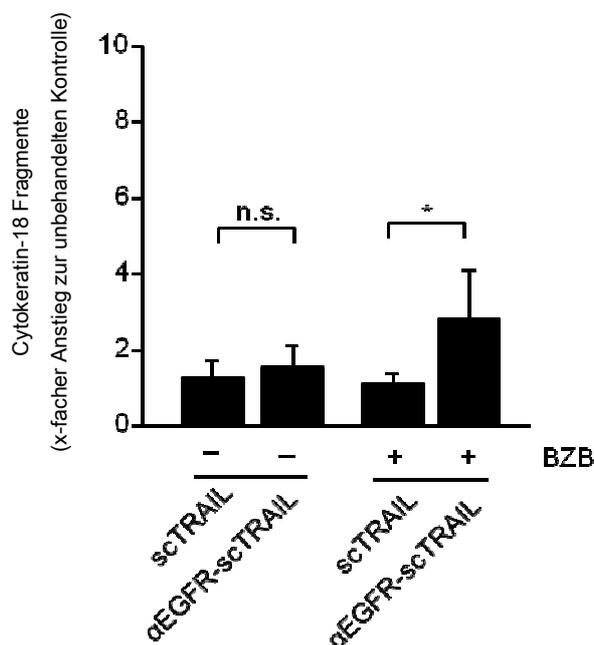


**Abb.20: RT-PCR von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im gesunden und HCC-Lebergewebe nach Bortezomib-Behandlung.** Expression von TRAIL-R1 (A) und TRAIL-R2 (B) in gesundem (grau; n=6) und HCC-Lebergewebe (schwarz; n=10) nach Behandlung mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Als Normierung diente GAPDH. \*p<0,05 signifikant

Durch die Bortezomib-Behandlung wurde sowohl eine signifikant verstärkte Expression von TRAIL-R1 (Abb.20A; p<0,05) als auch von TRAIL-R2 (Abb.20B; p<0,05) im HCC-Lebergewebe (8,8±5,4 und 5,9±3,4) gegenüber gesundem Lebergewebe (1,0±0,3 und 0,5±0,2) erzielt. Bortezomib führte somit zur signifikanten Induktion der agonistischen TRAIL-Rezeptor Expression im HCC-Gewebe, jedoch nicht im gesunden Lebergewebe. Diese Beobachtung könnte die selektive Zelltodinduktion durch αEGFR-scTRAIL mit Bortezomib im HCC-Gewebe erklären. Entsprechend weist die Kombination von αEGFR-scTRAIL mit Bortezomib im gesunden Lebergewebe keine Toxizität auf.

### Nachweis von Effektorcaspase-3 und Cytokeratin-18 im HCC-Lebergewebe

Um zu analysieren in welchen Zellen im HCC-Lebergewebe die Caspasen-Aktivierung durch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib hervorgerufen wird, wurde das entsprechend behandelte HCC-Gewebelysate mittels Immunassay quantitativ auf Cytokeratin-18 Fragmente (CK-18), die während der Hepatozyten-Apoptose durch aktivierte Caspasen generiert werden, untersucht.

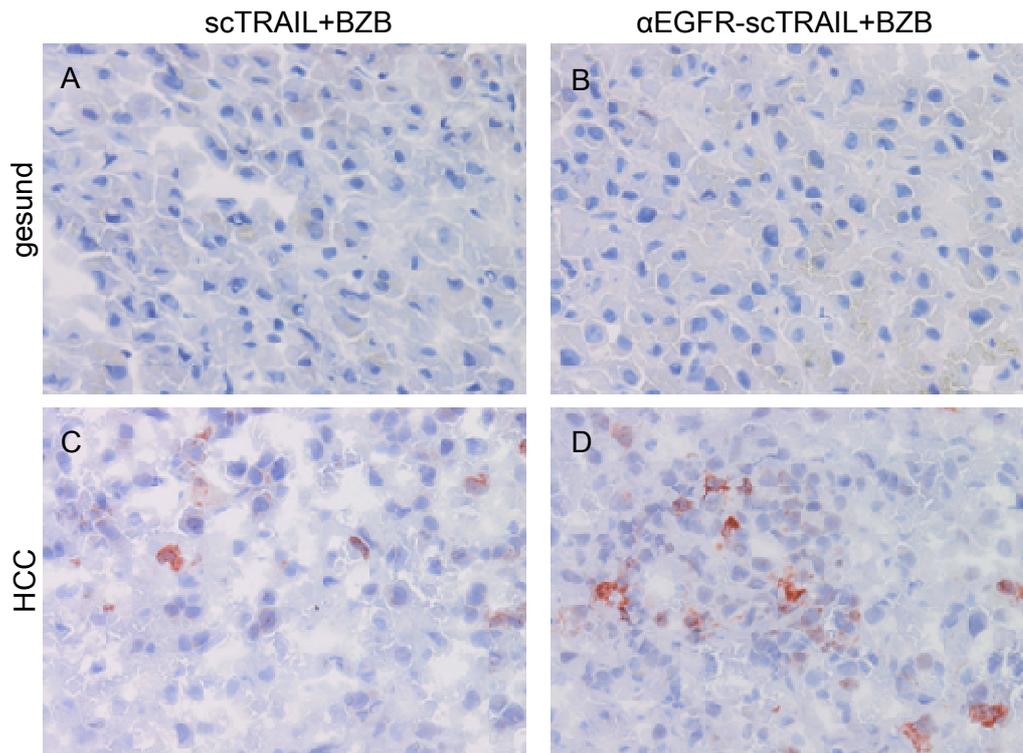


**Abb.21: Spaltung von Cytokeratin-18 nach Apoptose-Induktion durch scTRAIL bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib im HCC-Lebergewebe.** Dargestellt ist der x-fache Anstieg der Cytokeratin-18 Fragmente im Lysat von HCC-Lebergewebe (n=8) nach Apoptose-Induktion durch scTRAIL bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine bzw. in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. \* signifikant p < 0,05; n.s. nicht signifikant

Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Behandlung von HCC-Lebergewebe (n=8) mit nicht tumorspezifischen scTRAIL und Bortezomib ( $1,4 \pm 0,4$  Anstieg) durch die Behandlung mit dem tumorspezifischen  $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib ( $4,0 \pm 1,3$  Anstieg) signifikant mehr CK-18 Fragmente gebildet werden (Abb.21). Keinen Unterschied gibt es nach der Behandlung mit den TRAIL-Konstrukten alleine (scTRAIL

1,9±0,9; αEGFR-scTRAIL 2,3±0,5). Die induzierte Caspasen-Aktivierung ist somit auf die Apoptose von hepatozellulären Karzinomzellen zurückzuführen.

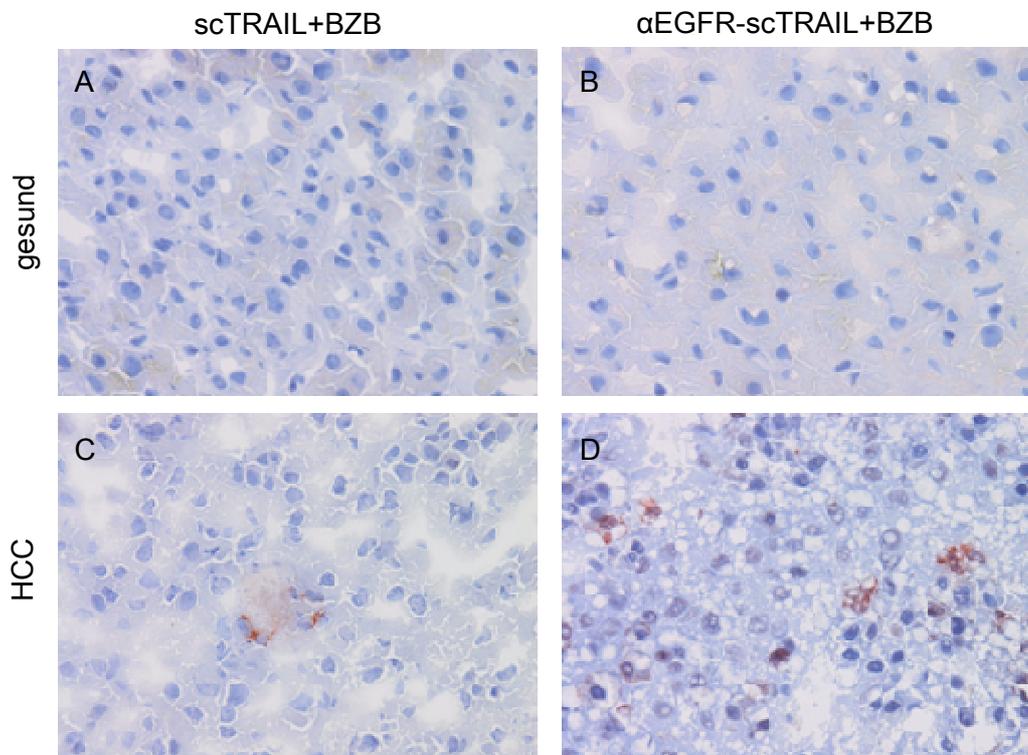
Ergänzend wurden immunhistochemische Analysen zur Caspase-3 Aktivierung und Caspase-gespaltenem Cytokeratin-18 im gesunden und HCC-Lebergewebe, die mit scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL jeweils in Kombination mit Bortezomib behandelt wurden, vorgenommen.



**Abb.22: Immunhistochemischer Nachweis von aktivierter Caspase-3 in gesundem und HCC-Lebergewebe.** Nach Behandlung von gesundem (A,B) und HCC-Lebergewebe (C,D) mit scTRAIL (A,C) bzw. αEGFR-scTRAIL (B,D) in Kombination mit Bortezomib wurden in den Gewebeschnitten immunhistochemisch aktivierte Caspase-3 nachgewiesen (400-fache Vergrößerung).

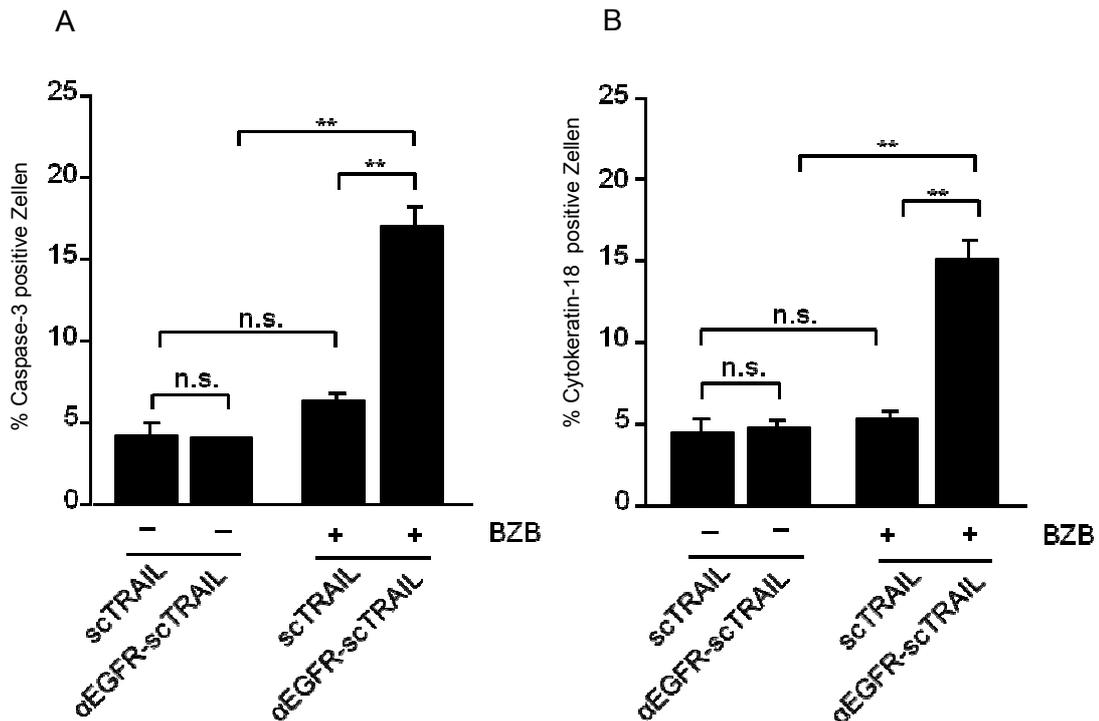
In gesundem Lebergewebe konnte durch die jeweiligen TRAIL-Versionen in Kombination mit Bortezomib keine relevante Caspase-3 Aktivierung (Abb.22A/B) bzw. Cytokeratin-18 Spaltung (Abb.23A/B) verzeichnet werden. Dagegen konnte durch die verschiedenen TRAIL-Versionen mit Bortezomib im HCC-Gewebe Caspase-3 Aktivierung (Abb.22C/D) sowie Cytokeratin-18 Spaltung (Abb.23C/D) induziert werden. Durch die Behandlung von HCC-Gewebe mit αEGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib konnte eine stärker

ausgeprägte Caspase-3 Aktivierung und Cytokeratin-18 Spaltung im Vergleich zu scTRAIL mit Bortezomib verzeichnet werden.



**Abb.23: Immunhistochemischer Nachweis von durch Caspasen-gespaltenes Cytokeratin-18 in gesundem und HCC-Lebergewebe.** Nach Behandlung von gesundem (A,B) und HCC-Lebergewebe (C,D) mit scTRAIL (A,C) bzw. αEGFR-scTRAIL (B,D) in Kombination mit Bortezomib wurden in den Gewebeschnitten immunhistochemisch Caspase-gespaltenes Cytokeratin-18 nachgewiesen (400-fache Vergrößerung).

Um diese immunhistochemischen Ergebnisse quantitativ zu verifizieren, wurden in den entsprechend behandelten HCC-Leberexplantaten (n=3) positive Hepatozyten für Caspase-3 Aktivierung und Cytokeratin-18 Fragmente in jeweils 4 mikroskopischen Feldern ausgezählt und der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl errechnet (Abb. 24). Die kombinierte Behandlung von HCC-Lebergewebe mit αEGFR-scTRAIL und Bortezomib induzierte eine signifikant stärkere Caspase-3 Aktivierung ( $17,0 \pm 1,2\%$  positive Zellen) im Vergleich zur kombinierten Behandlung mit scTRAIL und Bortezomib ( $6,3 \pm 0,5\%$  positive Zellen; scTRAIL alleine  $4,3 \pm 0,7\%$  positive Zellen) oder zu αEGFR-scTRAIL alleine ( $4,0 \pm 0,03\%$  positive Zellen;  $p < 0,01$ ; Abb.24A).

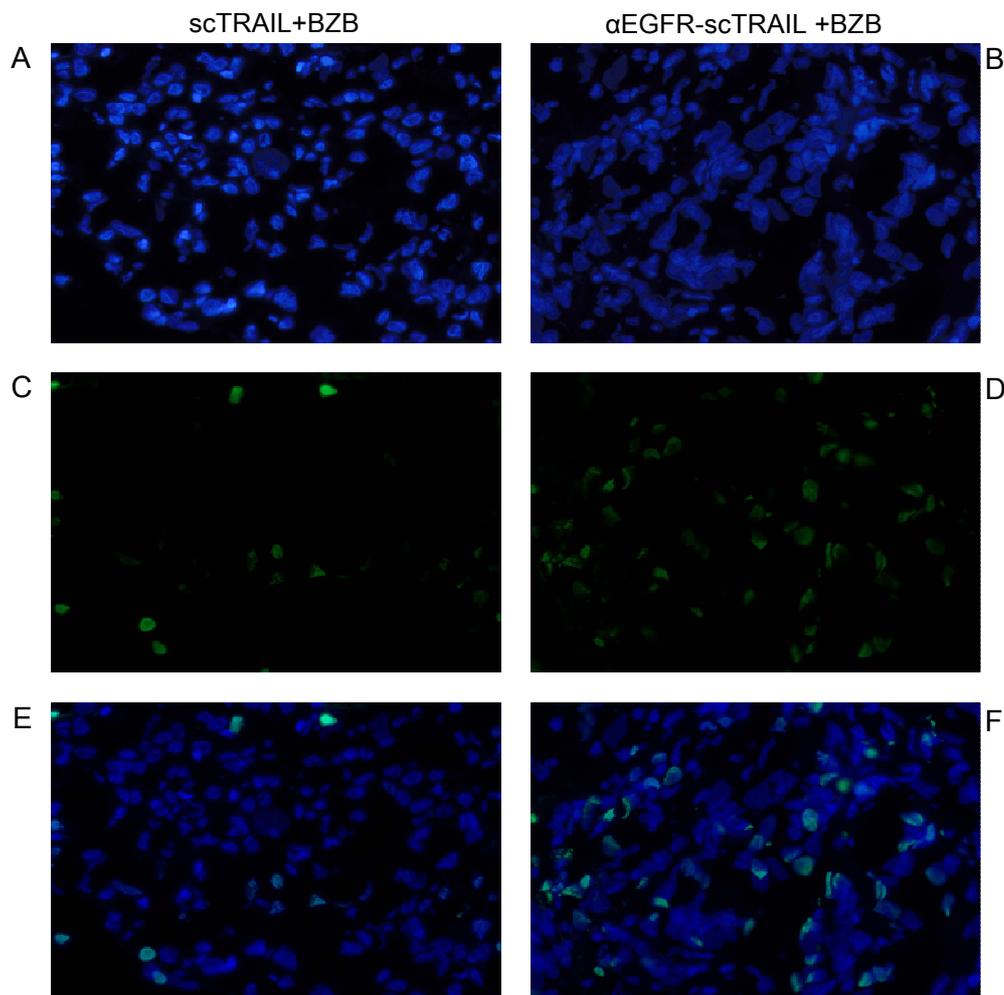


**Abb.24: Quantifizierung der Caspase-3 Aktivität und der Cytokeratin-18 Spaltung im HCC-Lebergewebe.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil von positiven Zellen für aktivierte Caspase-3 (A) und CK-18 Fragmente (B) nach Behandlung von HCC Lebergewebe (n=3) mit scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine oder kombiniert mit Bortezomib. Auszählung von 4 mikroskopischen Feldern pro Gewebeschnitt in 400-facher Vergrößerung. \*\*p<0,01 hoch signifikant; n.s. nicht-signifikant

Entsprechend konnten im HCC-Gewebe, das mit αEGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib behandelt wurde (15,1±1,2% positive Zellen) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit αEGFR-scTRAIL (4,8±0,4% positive Zellen) oder im Vergleich zu scTRAIL mit Bortezomib (5,4±0,5% positive Zellen; scTRAIL alleine 4,5±0,8% positive Zellen) signifikant mehr CK-18 Fragmente detektiert werden (Abb.24B; p<0,01).

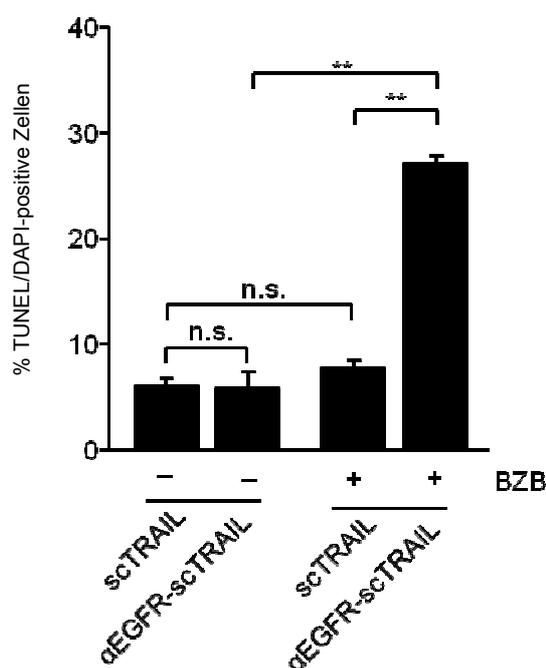
### Zelltod-Analyse von HCC-Lebergewebe nach Behandlung mit scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib

Während des Zelltodes kommt es durch die DNase Aktivität nicht nur zur Bildung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit niedrigem Molekulargewicht (Mono- und Oligonukleosome), sondern auch zu Einzelstrang-Brüchen der DNA mit hohem Molekulargewicht. Diese DNA-Strangbrüche können mit Hilfe der TUNEL-Technik (TdT-vermittelte dUTP *nick end labeling*) nachgewiesen werden. Zur Verifizierung des Zelltodes wurde die TUNEL-Reaktivität auf HCC-Lebergewebe analysiert (n=3; Abb.25).



**Abb.25: Immunfluoreszenz-Färbung zur Bestimmung der TUNEL-Reaktivität im HCC-Lebergewebe.** Nach Behandlung mit scTRAIL (A,C,E) bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL (B,D,F) in Kombination mit Bortezomib wurden die Gewebeschnitte mit TUNEL-Reagenz und DAPI gefärbt (400-fache Vergrößerung). Durch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL und Bortezomib wurde ein höherer Anteil an TUNEL-positiven Zellen (grün) im Vergleich zu scTRAIL mit Bortezomib im HCC-Gewebe erzielt. Durch die Kernfärbung mittel DAPI (blau) wurde die Kernspezifität der TUNEL-Reaktion bestätigt (Overlay).

Für die quantitative Analyse der TUNEL-positiven Zellen wurden in den entsprechend behandelten HCC-Gewebeschnitten (n=3) jeweils 4 mikroskopische Felder in 400-facher Vergrößerung ausgezählt und der prozentuale Anteil an TUNEL/DAPI-doppelpositiven Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt (Abb.26). Zwischen den mit scTRAIL (6,1±0,8%) bzw. αEGFR-scTRAIL (5,9±1,6%) alleine behandelten HCC-Gewebeschnitten war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zelltod-Rate (TUNEL-Reaktivität) zu verzeichnen.

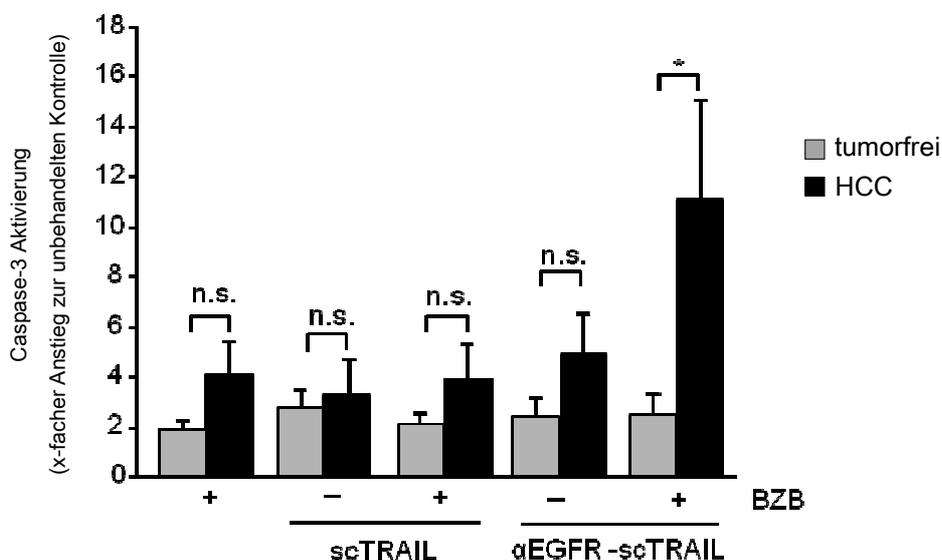


**Abb.26: Quantifizierung der TUNEL-Reaktivität im HCC-Lebergewebe.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an TUNEL/DAPI-doppelpositiven Zellen an der Gesamtzellzahl nach Behandlung des HCC-Lebergewebes (n=3) mit scTRAIL bzw. αEGFR-scTRAIL alleine und in Kombination mit Bortezomib. Ausgezählt wurden je 4 mikroskopische Felder pro Gewebeschnitt in 400-facher Vergrößerung. \*\*p<0,01 hoch signifikant; n.s. nicht signifikant

Jedoch konnte durch die Sensitivierung mit Bortezomib ein signifikanter Unterschied (p<0,01) zwischen den TRAIL-Versionen erzielt werden (scTRAIL 7,8±0,8% bzw. αEGFR-scTRAIL 27,2±0,7% TUNEL/DAPI-doppelpositive Zellen). Durch die kombinierte Behandlung des HCC-Lebergewebes mit αEGFR-scTRAIL und Bortezomib konnte signifikant mehr Zelltod im Vergleich zum tumorspezifischen Konstrukt alleine induziert werden (p<0,01).

### Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib im tumorfreien und HCC-Lebergewebe

Um herauszufinden, ob die verschiedenen TRAIL-Versionen in Kombination mit Bortezomib Caspasen-Aktivierung als Hinweis auf Toxizität im tumorfreien (zirrhotischen) Lebergewebe induzieren, wurde eine vergleichende Analyse der jeweiligen Konstrukte alleine und in Kombination mit Bortezomib bezüglich der Caspasen-Aktivierung im HCC-Gewebe sowie tumorfreien (zirrhotischen) Lebergewebe der jeweiligen Patienten vorgenommen (Abb.27).



**Abb.27: Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in tumorfreiem und HCC-Lebergewebe.** Dargestellt ist der x-fache Anstieg der Caspasen-Aktivität nach Behandlung mit scTRAIL (n=3) bzw.  $\alpha$ EGFR-scTRAIL (n=5) alleine und mit Bortezomib in tumorfreiem (grau) und HCC-Lebergewebe (schwarz) derselben Patienten. \*p<0,05 signifikant; n.s. nicht signifikant

Weder Bortezomib ( $4,1 \pm 1,3$  Tumor versus  $1,9 \pm 0,4$  tumorfrei; Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), noch scTRAIL ( $3,3 \pm 1,4$  versus  $2,8 \pm 0,7$ ) oder  $\alpha$ EGFR-scTRAIL ( $4,9 \pm 1,6$  versus  $2,4 \pm 0,7$ ) alleine erhöhten signifikant die Caspasen-Aktivität im HCC-Lebergewebe (schwarz) im Vergleich zum tumorfreiem Lebergewebe (grau). Dagegen wurde durch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) der Caspasen-Aktivität im HCC-Gewebe im Vergleich zu tumorfreien Lebergewebe erzielt ( $11,1 \pm 3,9$  versus  $2,5 \pm 0,8$ ). Das nicht tumorspezifische TRAIL in Kombination mit Bortezomib führte zu keinem signifikanten Anstieg der Caspasen-Aktivität im HCC-Lebergewebe im Vergleich zum tumorfreien Lebergewebe ( $3,9 \pm 1,4$  versus  $2,1 \pm 0,4$ ).

## D DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte sowohl *in vitro* in Hepatoma-Zellen als auch *ex vivo* auf humanem HCC-Lebergewebe gezeigt werden, dass nach Vorbehandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib die für den EGF-Rezeptor spezifische TRAIL-Version zu mehr Caspasen-Aktivität und Zelltod führt als das nicht tumorspezifische scTRAIL. Auf primären, humanen Hepatozyten (PHH) oder gesundem Lebergewebe hatten beide TRAIL-Versionen in Kombination mit Bortezomib keine hepatotoxische Wirkung. Auch die vergleichenden Untersuchungen von HCC- und dem umgebenden tumorfreien Lebergewebe derselben Patienten untermauern die Tumorspezifität des EGF-R-targeted TRAIL, verbunden mit einer höheren Apoptose-Effizienz im Tumorgewebe und verminderter Toxizität im zirrhotischen, tumorfreien Gewebe.

Für Patienten mit fortgeschrittenem HCC stehen derzeit nur sehr begrenzte Therapie-Optionen zur Verfügung, da sich das HCC gegenüber systemischer Chemotherapie weitestgehend als resistent erweist. Im Hinblick auf den -wenn auch limitierten- Therapieerfolg des Multikinase-Inhibitors Sorafenib beim HCC stellen zielgerichtete Therapiestrategien einen vielversprechenden Ansatz dar. Diesbezüglich könnte sich TRAIL als pro-apoptische Substanz erfolgreich erweisen, da Tumore durch eine verminderte Apoptoserate gekennzeichnet sind und TRAIL im Gegensatz zu TNF oder CD95L selektiv Apoptose in transformierten jedoch nicht in normalen Zellen induziert (Ashkenazi et al., 1999; Wajant, 2006; Walczak et al., 1999). Obwohl bereits einige klinische Studien mit TRAIL bei verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren vielversprechende Ergebnisse zeigten, wurde zunehmend erkannt, dass eine Monotherapie mit diesem Zytokin nicht zu dem gewünschten therapeutischen Erfolg führt (Ashkenazi et al., 2008b). Weiterhin konnte in Xenograft-Modellen mit TRAIL-resistenten Zellen des Pankreaskarzinoms und des Gallengangskarzinoms gezeigt werden, dass die Behandlung mit TRAIL sogar zu einer erhöhten Tumorzellmigration sowie zur Metastasierung führen kann (Ishimura et al., 2006; Trauzold et al., 2006). Es wird angenommen, dass bei Vorliegen einer TRAIL-Resistenz TRAIL eher Überlebens-Signalwege wie den NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) oder den MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*) Signalweg aktiviert als Apoptose induziert (Falschlehner et al., 2007; Ishimura et al., 2006; Varfolomeev et al., 2005). Eine Wiederherstellung der TRAIL-Sensitivität ist für die Apoptose-Induktion essentiell, nicht nur um den klinischen Nutzen zu erhöhen, sondern auch um Patienten vor unerwünschten Nebeneffekten zu schützen. Eine Kombination von TRAIL mit Apoptose-sensibilisierenden Substanzen scheint deshalb für die TRAIL-vermittelten antitumoralen Effekte unabdingbar zu sein.

Kürzlich konnte für Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib gezeigt werden, dass diese in bestimmten Tumorzellen u.a. auch in Hepatoma-Zellen zu deren Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose führen (Brooks et al., 2010; Ganten et al., 2006; Koschny et al., 2007a; Luster et al., 2009; Naumann et al., 2011; Smith et al., 2007). Diese Substanzen könnten anderen TRAIL-sensibilisierenden Substanzen überlegen sein, da die Inhibierung des Proteasoms, als Zentrum des Protein-Turnovers, verschiedene Signalwege der Apoptose und des Zellüberlebens beeinflusst. Mit großer Wahrscheinlichkeit können so mehrere Resistenz-Mechanismen umgangen werden. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass im HCC-Lebergewebe erhöhte Level des Caspase-inhibierenden Moleküls XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Augello et al., 2009; Shi et al., 2008) sowie eine gesteigerte Expression von einigen anti-apoptischen Mitgliedern des intrinsischen Signalweges wie z.B. Bcl-xL, Bcl-2 und Mcl-1 beobachtet wurden (Fleischer et al., 2006; Mott et al., 2007; Sieghart et al., 2006; Takehara et al., 2001; Wirth et al., 2005). In einigen Studien führte die Behandlung von HCC-Zellen mit Bortezomib zur Hochregulierung von TRAIL-R1 und -R2 auf der Tumorzelloberfläche zur verbesserten Bildung des DISC-Komplexes und ebenfalls zur verminderten Expression von cFLIP sowie von XIAP, wodurch der TRAIL-Resistenz in unterschiedlichen Bereichen des Apoptose-Signalweges entgegengewirkt wird (Brooks et al., 2010; Koschny et al., 2007a). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bortezomib auf die Expression von TRAIL-R1 und -R2 untersucht. Bortezomib führte zu einer verstärkten Expression dieser agonistischen TRAIL-Rezeptoren im HCC-Lebergewebe. Im gesunden Lebergewebe konnte weder auf unbehandeltem noch auf Bortezomib-behandeltem Gewebe diese TRAIL-Rezeptoren detektiert werden. Diese Ergebnisse wurden in anderen Studien bestätigt (Chen et al., 2009; Koschny et al., 2007a; Koschny et al., 2007b). Bortezomib beeinflusst nicht nur den extrinsischen, sondern auch den intrinsischen Signalweg durch Aktivierung von pro-apoptischen Molekülen der Bcl-2 Proteinfamilie wie tBid, Bak oder Bax (Koschny et al., 2007a; Naumann et al., 2011). Als eine mögliche Schlussfolgerung auf diese Beobachtungen könnten auch nicht transformierte Zellen so für die TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisiert werden (Falschlehner et al., 2009; Volkmann et al., 2007). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass HCV-infiziertes oder durch nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) vorgeschädigtes Lebergewebe, die zu den zu Grunde liegenden Vorerkrankungen des HCC gehören, eine erhöhte Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose aufweisen (Volkmann et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass entzündliche und cholestatische Leberschädigung sowohl murine als auch humane Hepatozyten gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensibilisieren, was auf die verstärkte Expression von agonistischen TRAIL-Rezeptoren sowie von pro-apoptischen Molekülen des mitochondrialen Signalweges zurückgeführt wurde (Higuchi et al., 2002; Janssen et al., 2003; Liang et al., 2007; Mundt et al., 2003; Volkmann et al., 2007). Deshalb

ist es besonders wichtig, beim therapeutischen Einsatz von TRAIL auf die Zellen des tumorfreien Lebergewebes zu achten. Ein therapeutisches Ziel wäre die Erhöhung der antitumoralen Wirksamkeit bei gleichzeitiger Minimierung der Toxizität gegenüber tumorfreiem Gewebe. Dieses Ziel könnte durch ein neues Proteindesign unter Verwendung von rekombinanten Liganden der TNF-Familie, die gegen bestimmte Zielstrukturen im Tumorgewebe gerichtet sind, erreicht werden (Gerspach et al., 2009b). In diesem Kontext gelang die Herstellung eines TRAIL-Fusionsproteins, das gegen den EGF-Rezeptor (erbB1 oder Her1/neu) gerichtet ist, der im HCC-Lebergewebe verstärkt exprimiert ist (Breuhahn et al., 2006; Buckley et al., 2008; Schneider et al., 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor im HCC-Lebergewebe, jedoch nicht im gesunden Lebergewebe hochreguliert ist. Durch die Bindung des EGFR-Fusionsproteins an die Oberfläche von EGF-Rezeptor positiven Hepatoma-Zellen wird funktionell das membrangebundene TRAIL imitiert (Gerspach et al., 2009b; Siegemund et al., 2012). Durch die Bindung der Liganden an die TRAIL-Rezeptoren wird die apoptotische Signalkaskade ausgelöst. Trotz *in vitro* zu verzeichnender partieller Blockade des EGF-Rezeptor-Signalweges durch dieses TRAIL-Konstrukt konnten *in vivo* keine relevanten aktivierenden oder inhibierenden Effekte auf diesem Signalweg verzeichnet werden (Schneider et al., 2010). Die durch dieses Fusionsprotein induzierte Apoptose wird deshalb auf die TRAIL-Komponente zurückgeführt. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Anti-Tumor-Wirksamkeit des tumorspezifischen  $\alpha$ -EGFR-scTRAIL mit dem unspezifischen scTRAIL zu vergleichen. Als Hypothese wurde angenommen, dass das tumorspezifische TRAIL-Protein stärkere antitumorale Eigenschaften aufweist. In Bezug auf Vorarbeiten zu Dosisfindung wurde in dieser Arbeit für alle Experimente eine Konzentration der TRAIL-Fusionsproteine von 100ng/ml eingesetzt. Höhere Konzentrationen in Gegenwart des Proteasom-Inhibitors Bortezomib führten nicht zu höheren Zelltod-Raten (Kelley et al., 2001; Siegemund et al., 2012; Xiang et al., 2004). Für die Vorbehandlung der Zellen bzw. des Gewebes mit Bortezomib wurde eine Konzentration von 500ng/ml (1,3 $\mu$ M) gewählt, da sich diese Konzentration in Kombination mit Bortezomib als nicht toxisch für primäre humane Hepatozyten erwies und im therapeutischen Bereich bezogen auf die bei Patienten mit multiplem Myelom gemessenen Plasmaspiegel liegt (Koschny et al., 2007a; Stanford et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte *in vitro* in Hepatoma-Zellen und erstmals *ex vivo* in HCC-Explantaten gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Proteasom-Inhibition die zielgerichtete TRAIL-Behandlung von HCC-Zellen bzw. -Gewebe der nicht zielgerichteten TRAIL-Behandlung in Bezug auf Caspasen-Aktivierung und Zelltod-Induktion überlegen ist. Dies ist auf die erhöhte Bioaktivität des zielgerichteten TRAIL in den Tumorzellen und nicht auf die EGF-Rezeptor

inhibierenden Eigenschaften des Fusionsproteins zurückzuführen (Doody et al., 2007; Ng et al., 2004), da durch den Einsatz von EGFR-Antikörpern wie Cetuximab die Bindung und Wirkung von  $\alpha$ EGFR-scTRAIL an den Zielzellen kompetitiv blockiert werden konnte (Schneider et al., 2010; Siegemund et al., 2012). Ergänzend konnten in dieser Arbeit mögliche Apoptose-induzierende Effekte durch das EGFR-spezifische Antikörperfragment, abgeleitet vom chimären anti-EGFR Antikörper Cetuximab, ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz eines neutralisierenden TRAIL-Antikörpers konnten die Apoptose-induzierenden Effekte von  $\alpha$ EGFR-scTRAIL blockiert werden. Darüber hinaus konnte die durch das zielgerichtete TRAIL induzierte Aktivierung von Initiatorcaspase-8 als DISC-Komponente durch Caspasen-Inhibition (QVAD) vollständig aufgehoben werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die durch  $\alpha$ EGFR-scTRAIL hervorgerufene antitumorale Wirkung spezifisch auf TRAIL und nicht auf unspezifische oder über EGF-Rezeptor vermittelte Effekte zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung der erhöhten Bioaktivität des spezifischen  $\alpha$ EGFR-scTRAIL gegenüber dem unspezifischen scTRAIL ist seine Imitierung als membrangebundene Form von TRAIL an der Oberfläche der Tumorzellen im Gewebeverband und das dadurch hervorgerufene bevorzugte Crosslinking von TRAIL-R2. Dagegen fungiert das scTRAIL als lösliche Form von TRAIL und bindet dabei eher an TRAIL-R1 bzw. an die antagonistischen Rezeptoren, die kein Apoptosesignal auslösen (Kelley et al., 2005; Wajant et al., 2001). Beide agonistischen Rezeptoren wurden auf unbehandeltem HCC-Lebergewebe nach Behandlung mit Bortezomib nachgewiesen. Trotz der relativ gleichmäßigen Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf verschiedenen Tumorzellen, interagiert hauptsächlich TRAIL-R2 als Übermittler des Rezeptor-vermittelten TRAIL-Apoptosesignals (Ashkenazi et al., 2008a; van der Sloot et al., 2006), wodurch die höhere pro-apoptotische Aktivität des spezifischen  $\alpha$ EGFR-scTRAIL vergleichend zum scTRAIL erklärt werden könnte. Die Unterschiede in der TRAIL-Rezeptor Expression könnte auch die unterschiedliche Empfindlichkeit von Huh7 Zellen im Vergleich zum HCC-Lebergewebe gegenüber scTRAIL- und  $\alpha$ EGFR-scTRAIL- induzierter Apoptose erklären. Darüber hinaus könnte die TRAIL-Sensitivität auch durch die Homogenität der Zellkulturbedingungen oder der Heterogenität der Zellpopulation im Gewebe, verbunden mit dem entzündlichen Tumormilieu des intakten Lebergewebes beeinflusst werden.

Im Hinblick auf die signifikante Caspasen-Aktivierung und Zelltod-Induktion von  $\alpha$ EGFR-scTRAIL in Kombination mit Bortezomib in HCC-Zellen bzw. -Gewebe wurde der Frage nachgegangen, ob diese Kombination Toxizität auf normalen Leberzellen bewirkt. Weder in primären, humanen Hepatozyten noch in gesundem Lebergewebe konnte durch den kombinierten Einsatz von zielgerichtetem TRAIL und Bortezomib Caspasen-Aktivierung bzw. Zelltod induziert werden. Gesundes Lebergewebe zeigte auch keine Expression für den

EGF-Rezeptor. Möglicherweise wird durch das gezielte *Targeting* des EGF-Rezeptor positiven Tumorgewebes durch TRAIL gesundes EGF-Rezeptor negatives Lebergewebe vor Toxizität geschützt. Der Einsatz von nicht tumorspezifischem TRAIL mit Bortezomib induzierte weder im gesunden Lebergewebe noch in HCC-Lebergewebe eine signifikante Caspasen-Aktivierung. Im Hinblick auf diese und in anderen Arbeiten erzielten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass TRAIL in Kombination mit Bortezomib in normalen Hepatozyten nicht toxisch ist (Koschny et al., 2007a). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Bortezomib eine verstärkte Expression agonistischer TRAIL-Rezeptoren im HCC-Gewebe, jedoch nicht im gesunden Lebergewebe hervorruft. Dies bedeutet, dass Bortezomib selektiv Tumorgewebe und nicht gesundes Lebergewebe gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibilisiert. Da das HCC auf dem Boden von Lebererkrankungen entsteht und gezeigt werden konnte, dass beispielsweise bei entzündlichen Lebererkrankungen wie Virushepatitis oder nicht alkoholischer Fettlebererkrankung (NASH) eine erhöhte Sensitivität gegenüber TRAIL, bedingt durch eine veränderte Expression von pro- und anti-apoptischen Molekülen, besteht (Volkman et al., 2007), wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich die TRAIL-Proteine in Kombination mit Bortezomib als toxisch auf tumorfreiem, zirrhotischem Lebergewebe erweisen. In den *ex vivo* Experimenten konnte eine signifikant höhere Caspasen-Aktivität im HCC-Lebergewebe im Vergleich zum tumorfreien Gewebe detektiert werden. Ein möglicher Grund für die verminderte Sensitivität gegenüber scTRAIL des tumorfreien Lebergewebes von HCC-Patienten könnte eine verringerte Entzündung im zirrhotischen Lebergewebe sein, was möglicherweise zu einem veränderten Expressionsprofil von Apoptose-Regulatoren wie z.B. die erhöhte Expression von antagonistischen TRAIL-Rezeptoren oder anti-apoptischen Molekülen wie Bcl-2 führt (Chen et al., 2003; Frommel et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass primäre murine Hepatozyten während der Fibrogenese durch Kollagen I eine Apoptose-Resistenz entwickeln. Dies korrelierte mit einer verminderten Expression von pro-apoptischen Molekülen wie Bax oder Bak und einer höheren Expression von anti-apoptischen Regulatoren wie Bcl-xL. (Bourbonnais et al., 2012). Somit könnte eine erhöhte Expression von anti-apoptischen Molekülen bei fortgeschrittener Fibrose/Leberzirrhose, die der HCC-Entwicklung zu Grunde liegt, das tumorfreie Lebergewebe vor Apoptose schützen. Da in dieser Arbeit nur eine begrenzte Anzahl an tumorfreiem und HCC-Lebergewebe desselben Patienten untersucht wurde, kann eine fehlende Hepatotoxizität von TRAIL gegenüber tumorfreiem Lebergewebe nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Dies ist insbesondere bei Erkrankungen zu berücksichtigen, die bereits in Abwesenheit von Leberzirrhose mit HCC-Entwicklung assoziiert werden, wie beispielsweise die chronische Hepatitis B Virusinfektion oder nicht alkoholischer Steatohepatitis (Ertle et al., 2011; Liu et al., 2006). Für die Tumor-Behandlung mit rekombinantem TRAIL oder agonistischen TRAIL-

---

R1 und -R2 Antikörpern ist es deshalb nicht nur wichtig die TRAIL-Empfindlichkeit der Tumorzellen selbst zu betrachten, sondern auch die Faktoren im umgebenden Milieu. Weitere Studien sind erforderlich um zu evaluieren, ob durch EGFR-*Targeting* mögliche toxische Effekte von TRAIL im tumorfreien Lebergewebe vermieden werden können.

## E Fazit & Ausblick

Mit dieser Arbeit wird ein neues Konzept für die zielgerichtete Behandlung des HCC und anderer EGF-Rezeptor positiven, soliden Tumoren vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass gegen EGF-Rezeptor positive Tumorzellen gerichtetes TRAIL in Kombination mit Bortezomib eine signifikant höhere antitumorale Aktivität gegenüber nicht zielgerichtetem TRAIL aufweist. Da die zielgerichtete Therapie mit  $\alpha$ EGFR-scTRAIL und Bortezomib keine toxischen Effekte in gesundem bzw. tumorfreiem HCC-Lebergewebe auslöst, könnte dies eine mögliche innovative zukünftige Therapieoption zur Behandlung von HCC-Patienten sein. Als mögliche nächste Schritte sollte die antitumorale Aktivität des EGFR-spezifischen TRAIL allein und kombiniert mit Bortezomib in einem Xenograft-Mausmodell getestet werden. Murine Xenograft-Modelle sind gut geeignet, um neue Therapiestrategien präklinisch *in vivo* zu testen (Huynh et al., 2006). In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass gegen EGFR-gerichtetes TRAIL in Kombination mit Bortezomib im murinen Kolonkarzinom Xenograft-Modell zur Reduktion des Tumorumens im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen führte (Siegemund et al., 2012). Im Hinblick auf die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wäre eine vergleichende Analyse von  $\alpha$ EGFR-scTRAIL und scTRAIL jeweils in Kombination mit Bortezomib im HCC Xenograft-Modell der Maus anzustreben.

Da die Bioaktivität des TRAIL-Moleküls von der Oligomerisierung abhängt, könnte ein dimeres EGFR-spezifisches TRAIL-Fusionsprotein zur Steigerung der antitumoralen Eigenschaften führen. Durch Siegemund et al. (2012) wurde ein solches Fusionsprotein („Diabody“- $\alpha$ EGFR-scTRAIL oder Db- $\alpha$ EGFR-scTRAIL) entwickelt und bereits in verschiedenen EGF-Rezeptor positiven Karzinomzelllinien getestet. In Huh7 Zellen zeigte das dimere  $\alpha$ EGFR-scTRAIL kombiniert mit Bortezomib eine stärkere apoptotische Wirkung als die monomere Form. Dabei waren auch mit der dimeren tumorspezifischen TRAIL-Variante keine toxischen Effekte auf primären humanen Hepatozyten zu verzeichnen. Auch *in vivo* im Kolonkarzinom Xenograft-Mausmodell führte das Db- $\alpha$ EGFR-scTRAIL mit Bortezomib zu einem verlangsamten Tumorwachstum im Vergleich zum  $\alpha$ EGFR-scTRAIL bzw. scTRAIL kombiniert mit Bortezomib (Siegemund et al., 2012). Eine vergleichende Analyse der verschiedenen zielgerichteten TRAIL-Versionen *ex vivo* im intakten HCC- und tumorfreien Lebergewebe sowie *in vivo* im HCC Xenograft-Mausmodell wäre deshalb vielversprechend.

Als weitere Therapieoptionen könnten anstelle des Proteasom Inhibitors Bortezomib andere Apoptose-sensitivierende Substanzen wie z.B. der Multikinase-Inhibitor Sorafenib oder der mTOR-Inhibitor Rapamycin zum Einsatz kommen. Sorafenib, Handelsname Nexavar,

blockiert die Ras-Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, die wichtig für das Wachstum von soliden Tumoren ist, sowie andere Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie VEGFR/PDGFR oder c-kit (Downward, 2006; Wilhelm et al., 2006). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Sorafenib, das für die Behandlung des fortgeschrittenen Leberzellkarzinoms zugelassen ist, humane TRAIL-resistente Tumorzellen wie u.a. Hepatoma-, Pankreas- und Leukämie-Zellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose sensitiviert (Chen et al., 2010; Huang et al., 2010; Ricci et al., 2007; Rosato et al., 2007). Eine Vorbehandlung der Zellen mit Sorafenib führte zu einer verringerten Expression von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-xL oder cFLIP sowie zur Inaktivierung von Mcl-1 (Rosato et al., 2007). Das *Target* von Rapamycin ist mTOR, das Schlüsselmolekül des PI3K/PKB/Akt-mTOR Signalweges. Durch die Aktivierung verschiedener *downstream*-Moleküle nimmt mTOR Einfluss auf den Zellzyklus, die Proteinsynthese bzw. die Apoptose (Dworakowska et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass im HCC im Vergleich zu gesundem oder tumorfreiem HCC-Lebergewebe Moleküle des mTOR-Signalweges wie pAkt, p27 oder pS6 verstärkt exprimiert werden und mit einer schlechten Prognose für diese Patienten einhergehen. Patienten mit einem aktivierten mTOR-Signalweg könnten möglicherweise von einer zielgerichteten Therapie gegen diesen Signalweg profitieren (Zhou et al., 2010). Klinische Studien sind erforderlich, um den Erfolg dieser personalisierten Therapiekonzepte zu belegen.

## F ANHANG

### Literaturverzeichnis

Arterburn, L. M., J. Zurlo, J. D. Yager, R. M. Overton and A. H. Heifetz (1995). "A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro." Hepatology 22(1): 175-187.

Ashkenazi, A. and R. S. Herbst (2008a). "To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists." Journal of Clinical Investigation 118(6): 1979-1990.

Ashkenazi, A., P. Holland and S. G. Eckhardt (2008b). "Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)." Journal of Clinical Oncology 26(21): 3621-3630.

Ashkenazi, A., R. C. Pai, S. Fong, S. Leung, D. A. Lawrence, et al. (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." Journal of Clinical Investigation 104(2): 155-162.

Augello, C., L. Caruso, M. Maggioni, M. Donadon, M. Montorsi, et al. (2009). "Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma." BMC Cancer 9: 125.

Beuttler, J., M. Rothdiener, D. Müller, F. Y. Frejd and R. E. Kontermann (2009). "Targeting of epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing tumor cells with sterically stabilized affibody liposomes (SAL)." Bioconjugate Chemistry 20(6): 1201-1208.

Blum, H. E. and H. C. Spangenberg (2007). "Hepatocellular carcinoma: an update." Archives of Iranian Medicine 10(3): 361-371.

Bodmer, J. L., N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, et al. (2000). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." Nature Cell Biology 2(4): 241-243.

Bourbonnais, E., V. A. Raymond, C. Ethier, B. N. Nguyen, M. S. El-Leil, et al. (2012). "Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury." Gastroenterology 142(1): 130-139

Bremer, E. and W. Helfrich (2006). "Targeting the messengers of death: the advent of selective activation of apoptosis for cancer therapy." Discovery Medicine 6(33): 113-117.

Breuhahn, K., T. Longerich and P. Schirmacher (2006). "Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma." Oncogene 25(27): 3787-3800.

Brooks, A. D., K. M. Jacobsen, W. Li, A. Shanker and T. J. Sayers (2010). "Bortezomib sensitizes human renal cell carcinomas to TRAIL apoptosis through increased activation of caspase-8 in the death-inducing signaling complex." Molecular Cancer Research 8(5): 729-738.

Buckley, A. F., L. J. Burgart, V. Sahai and S. Kakar (2008). "Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma." American Journal of Clinical Pathology 129(2): 245-251.

Chen, K. F., W. T. Tai, T. H. Liu, H. P. Huang, Y. C. Lin, et al. (2010). "Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3." Clinical Cancer Research 16(21): 5189-5199.

Chen, K. F., P. Y. Yeh, C. Hsu, C. H. Hsu, Y. S. Lu, et al. (2009). "Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." The Journal of Biological Chemistry 284(17): 11121-11133.

Chen, X. P., S. Q. He, H. P. Wang, Y. Z. Zhao and W. G. Zhang (2003). "Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and antitumor tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma." World Journal of Gastroenterology 9(11): 2433-2440.

Cornella, H., C. Alsinet and A. Villanueva (2011). "Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma." Alcoholism, Clinical and Experimental Research 35(5): 821-825.

Crawford, L. J., B. Walker and A. E. Irvine (2011). "Proteasome inhibitors in cancer therapy." Journal of Cell Communication and Signaling 5(2): 101-110.

Cretney, E., K. Takeda, H. Yagita, M. Glaccum, J. J. Peschon, et al. (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." Journal of Immunology 168(3): 1356-1361.

Daniel, P. (2002). "Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren."

Daniels, R. A., H. Turley, F. C. Kimberley, X. S. Liu, J. Mongkolsapaya, et al. (2005). "Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues." Cell Research 15(6): 430-438.

Doody, J. F., Y. Wang, S. N. Patel, C. Joynes, S. P. Lee, et al. (2007). "Inhibitory activity of cetuximab on epidermal growth factor receptor mutations in non small cell lung cancers." Molecular Cancer Therapeutics 6(10): 2642-2651.

Downward, J. (2006). "Signal transduction. Prelude to an anniversary for the RAS oncogene." Science 314(5798): 433-434.

Dworakowska, D., E. Wlodek, C. A. Leontiou, S. Igreja, M. Cakir, et al. (2009). "Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors." Endocrine-Related Cancer 16(4): 1329-1338.

Dyer, M. J., M. MacFarlane and G. M. Cohen (2007). "Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy." Journal of Clinical Oncology 25(28): 4505-4506.

EI-Serag, H. B. (2011). "Hepatocellular carcinoma." New England Journal of Medicine 365(12): 1118-1127.

Ertle, J., A. Dechene, J. P. Sowa, V. Penndorf, K. Herzer, et al. (2011). "Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis." International Journal of Cancer 128(10): 2436-2443.

Falschlehner, C., C. H. Emmerich, B. Gerlach and H. Walczak (2007). "TRAIL signalling: decisions between life and death." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39(7-8): 1462-1475.

Falschlehner, C., T. M. Ganten, R. Koschny, U. Schaefer and H. Walczak (2009). "TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics." Advances in Experimental Medicine and Biology 647: 195-206.

Fleischer, B., H. Schulze-Bergkamen, M. Schuchmann, A. Weber, S. Biesterfeld, et al. (2006). "Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma." International Journal of Oncology 28(1): 25-32.

Forner, A., J. M. Llovet and J. Bruix (2012). "Hepatocellular carcinoma." The Lancet 379(9822): 1245-1255.

Frommel, T. O., S. Yong and E. J. Zarling (1999). "Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 gene family expression in liver of hepatitis C and cirrhotic patients: a novel mechanism to explain the high incidence of hepatocarcinoma in cirrhotics." American Journal of Gastroenterology 94(1): 178-182.

Furuse, J. (2008). "Growth factors as therapeutic targets in HCC." Critical Reviews in Oncology/Hematology 67(1): 8-15.

Ganten, T. M., R. Koschny, T. L. Haas, J. Sykora, M. Li-Weber, et al. (2005). "Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL." Hepatology 42(3): 588-597.

Ganten, T. M., R. Koschny, J. Sykora, H. Schulze-Bergkamen, P. Buchler, et al. (2006). "Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs." Clinical Cancer Research 12(8): 2640-2646.

Gerspach, J., K. Pfizenmaier and H. Wajant (2009a). "Improving TNF as a cancer therapeutic: tailor-made TNF fusion proteins with conserved antitumor activity and reduced systemic side effects." BioFactors 35(4): 364-372.

Gerspach, J., H. Wajant and K. Pfizenmaier (2009b). "Death ligands designed to kill: development and application of targeted cancer therapeutics based on proapoptotic TNF family ligands." Results and Problems in Cell Differentiation 49: 241-273.

Gines, P., A. Cardenas, V. Arroyo and J. Rodes (2004). "Management of cirrhosis and ascites." The New England Journal of Medicine 350(16): 1646-1654.

Greco, F. A., P. Bonomi, J. Crawford, K. Kelly, Y. Oh, et al. (2008). "Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer." Lung Cancer 61(1): 82-90.

Griffith, T. S., C. T. Rauch, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, et al. (1999). "Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies." Journal of Immunology 162(5): 2597-2605.

Grosse-Wilde, A., O. Voloshanenko, S. L. Bailey, G. M. Longton, U. Schaefer, et al. (2008). "TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development." Journal of Clinical Investigation 118(1): 100-110.

Guicciardi, M. E. and G. J. Gores (2005). "Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury." Gut 54(7): 1024-1033.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.

Higuchi, H., S. F. Bronk, M. Taniai, A. Canbay and G. J. Gores (2002). "Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 303(2): 461-467.

Huang, S. and F. A. Sinicrope (2010). "Sorafenib inhibits STAT3 activation to enhance TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells." Molecular Cancer Therapeutics 9(3): 742-750.

Huynh, H., K. C. Soo, P. K. Chow, L. Panasci and E. Tran (2006). "Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs." Clinical Cancer Research 12(14): 4306-14.

Hymowitz, S. G., M. P. O'Connell, M. H. Ultsch, A. Hurst, K. Totpal, et al. (2000). "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL." Biochemistry 39(4): 633-640.

Ichikawa, K., W. Liu, L. Zhao, Z. Wang, D. Liu, et al. (2001). "Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity." Nature Medicine 7(8): 954-960.

Ishimura, N., H. Isomoto, S. F. Bronk and G. J. Gores (2006). "TRAIL induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells." American Journal of Physiology & Gastrointestinal Liver Physiology 290(1): 129-136.

Janssen, H. L., H. Higuchi, A. Abdulkarim and G. J. Gores (2003). "Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression." Journal of Hepatology 39(3): 414-420.

Johnson, T. R., K. Stone, M. Nikrad, T. Yeh, W. X. Zong, et al. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells." Oncogene 22(32): 4953-4963.

Kelley, R. F., K. Totpal, S. H. Lindstrom, M. Mathieu, K. Billeci, et al. (2005). "Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling." The Journal of Biological Chemistry 280(3): 2205-2212.

Kelley, S. K., L. A. Harris, D. Xie, L. Deforge, K. Totpal, et al. (2001). "Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 299(1): 31-38.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim, et al. (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." Immunity 12(6): 611-620.

Koehler, B. C., T. Urbanik, B. Vick, R. J. Boger, S. Heeger, et al. (2009). "TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells is augmented by targeted therapies." World Journal of Gastroenterology 15(47): 5924-5935.

Koschny, R., T. M. Ganten, J. Sykora, T. L. Haas, M. R. Sprick, et al. (2007a). "TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window." Hepatology 45(3): 649-658.

Koschny, R., H. Holland, J. Sykora, H. Erdal, W. Krupp, et al. (2010). "Bortezomib sensitizes primary human esthesioneuroblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis." Journal of Neurooncology 97(2): 171-185.

Koschny, R., H. Holland, J. Sykora, T. L. Haas, M. R. Sprick, et al. (2007b). "Bortezomib sensitizes primary human astrocytoma cells of WHO grades I to IV for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis." Clinical Cancer Research 13(11): 3403-3412.

Lashinger, L. M., K. Zhu, S. A. Williams, M. Shrader, C. P. Dinney, et al. (2005). "Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells." Cancer Research 65(11): 4902-4908.

LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." Cell Death & Differentiation 10(1): 66-75.

Liang, X., J. Du, Y. Liu, M. Cui, C. Ma, et al. (2007). "The hepatitis B virus protein MHBs(t) sensitizes hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through ERK2." Apoptosis 12(10): 1827-1836.

Liu, C. J., B. F. Chen, P. J. Chen, M. Y. Lai, W. L. Huang, et al. (2006). "Role of hepatitis B virus precore/core promoter mutations and serum viral load on noncirrhotic hepatocellular carcinoma: a case-control study." The Journal of Infectious Diseases 194(5): 594-599.

Llovet, J. M. and J. Bruix (2008). "Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008." Journal of Hepatology 48 20-37.

Luster, T. A., J. A. Carrell, K. McCormick, D. Sun and R. Humphreys (2009). "Mapatumumab and lexatumumab induce apoptosis in TRAIL-R1 and TRAIL-R2 antibody-resistant NSCLC cell lines when treated in combination with bortezomib." Molecular Cancer Therapeutics 8(2): 292-302.

Malhi, H., G. J. Gores and J. J. Lemasters (2006). "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" Hepatology 43: 31-44.

Martinon, F. and J. Tschopp (2004). "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases." Cell 117(5): 561-574.

Mott, J. L. and G. J. Gores (2007). "Piercing the armor of hepatobiliary cancer: Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetics and cell death." Hepatology 46(3): 906-911.

Mühlenbeck, F., P. Schneider, J. L. Bodmer, R. Schwenzer, A. Hauser, et al. (2000). "The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation." Journal of Biological Chemistry 275(41): 32208-32213.

Mundt, B., F. Kühnel, L. Zender, Y. Paul, H. Tillmann, et al. (2003). "Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis." Faseb Journal 17(1): 94-96.

Myung, J., K. B. Kim and C. M. Crews (2001). "The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors." Medicinal Research Reviews 21(4): 245-273.

Nagy, K., K. Szekely-Szuts, K. Izeradjene, L. Douglas, M. Tillman, et al. (2006). "Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria." Pathology Oncology Research 12(3): 133-142.

Naka, T., K. Sugamura, B. L. Hylander, M. B. Widmer, Y. M. Rustum, et al. (2002). "Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice." Cancer Research 62(20): 5800-5806.

Nanji, A. A. and S. Hiller-Sturmhofel (1997). "Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease." Alcohol Health and Research World 21(4): 325-330.

Naumann, I., R. Kappler, D. von Schweinitz, K. M. Debatin and S. Fulda (2011). "Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway." Clinical Cancer Research 17(10): 3204-3218.

Neuman, M. G. (2001). "Apoptosis in diseases of the liver." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38(2): 109-166.

Ng, M. and D. Cunningham (2004). "Cetuximab (Erbix)--an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours." International Journal of Clinical Practice 58(10): 970-976.

Nüssler, A. K., N. C. Nüssler, V. Merk, M. Brulport, W. Schormann, et al. (2009). "The holy grail of hepatocyte culturing and therapeutic use." Regenerative Medicine Today: 283-320.

Osawa, Y., E. Seki and D. E. Brenner (2009). "Apoptosis in Liver Injury and Liver Diseases " Essentials of Apoptosis

Plummer, R., G. Attard, S. Pacey, L. Li, A. Razak, et al. (2007). "Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers." Clinical Cancer Research 13(20): 6187-6194.

Rajkumar, S. V., P. G. Richardson, T. Hideshima and K. C. Anderson (2005). "Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer." Journal of Clinical Oncology 23(3): 630-639.

Ricci, M. S., S. H. Kim, K. Ogi, J. P. Plataras, J. Ling, et al. (2007). "Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death." Cancer Cell 12(1): 66-80.

Rosato, R. R., J. A. Almenara, S. Coe and S. Grant (2007). "The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1 and cFLIPL down-regulation." Cancer Research 67(19): 9490-9500.

Rowinsky, E. K. (2005). "Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents." Journal of Clinical Oncology 23(36): 9394-9407.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-491.

Samel, D., D. Muller, J. Gerspach, C. Assouh-Luty, G. Sass, et al. (2003). "Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted Activation." Journal of Biological Chemistry 278(34): 32077-32082.

Sayers, T. J., A. D. Brooks, C. Y. Koh, W. Ma, N. Seki, et al. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP." Blood 102(1): 303-310.

Schneider, B., S. Munkel, A. Krippner-Heidenreich, I. Grunwald, W. S. Wels, et al. (2010). "Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins." Cell Death & Disease 1: e68.

Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." European Journal of Biochemistry 254(3): 439-459.

Shankar, S. and R. K. Srivastava (2004). "Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications." Drug Resistance Updates 7(2): 139-156.

Shi, Y. H., W. X. Ding, J. Zhou, J. Y. He, Y. Xu, et al. (2008). "Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence." Hepatology 48(2): 497-507.

Siegemund, M., N. Pollak, O. Seifert, K. Wahl, K. Hanak, et al. (2012). "Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity." Cell Death and Disease 3: e295.

Sieghart, W., D. Losert, S. Strommer, D. Cejka, K. Schmid, et al. (2006). "Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy." Journal of Hepatology 44(1): 151-157.

Smith, M. R., F. Jin and I. Joshi (2007). "Bortezomib sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cells to apoptosis induced by antibodies to tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2." Clinical Cancer Research 13(18): 5528-5534.

Sprick, M. R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand, et al. (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." The EMBO Journal 21(17): 4520-4530.

Stanford, B. L. and S. D. Zondor (2003). "Bortezomib treatment for multiple myeloma." The Annals of Pharmacotherapy 37(12): 1825-1830.

Takeda, K., M. J. Smyth, E. Cretney, Y. Hayakawa, N. Kayagaki, et al. (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." Journal of Experimental Medicine 195(2): 161-169.

Takehara, T., X. Liu, J. Fujimoto, S. L. Friedman and H. Takahashi (2001). "Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas." Hepatology 34(1): 55-61.

Thorpe, J. A., P. A. Christian and S. R. Schwarze (2008). "Proteasome inhibition blocks caspase-8 degradation and sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated apoptosis." The Prostate 68(2): 200-209.

Trauth and Keesey (1995). "Apoptosis Guide."

Trauzold, A., D. Siegmund, B. Schniewind, B. Sipos, J. Egberts, et al. (2006). "TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncogene 25(56): 7434-7439.

van der Sloot, A. M., V. Tur, E. Szegezdi, M. M. Mullally, R. H. Cool, et al. (2006). "Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor." PNAS 103(23): 8634-8639.

Varfolomeev, E., H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, et al. (2005). "Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." The Journal of Biological Chemistry 280(49): 40599-40608.

Volkman, X., U. Fischer, M. J. Bahr, M. Ott, F. Lehner, et al. (2007). "Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver." Hepatology 46(5): 1498-1508.

Voorhees, P. M. and R. Z. Orlowski (2006). "The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy." Annate Review of Pharmacology and Toxicology 46: 189-213.

Wajant, H. (2006). "CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy." Cancer Treatment and Research 130: 141-165.

Wajant, H., J. Gerspach and K. Pfizenmaier (2011). "Engineering death receptor ligands for cancer therapy." Cancer Letters.

Wajant, H., D. Moosmayer, T. Wuest, T. Bartke, E. Gerlach, et al. (2001). "Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative." Oncogene 20(30): 4101-4106.

Walczak, H., R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, et al. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." Nature Medicine 5(2): 157-163.

Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity 3(6): 673-682.

Wilhelm, S., C. Carter, M. Lynch, T. Lowinger, J. Dumas, et al. (2006). "Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer." Nature Reviews 5(10): 835-44.

Wirth, T., F. Kühnel, B. Fleischmann-Mundt, N. Woller, M. Djojosebroto, et al. (2005). "Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1." Cancer Research 65(16): 7393-7402.

Xiang, H., C. B. Nguyen, S. K. Kelley, N. Dybdal and E. Escandon (2004). "Tissue distribution, stability, and pharmacokinetics of Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human colon carcinoma COLO205 tumor-bearing nude mice." Drug Metabolism and Disposition 32(11): 1230-1238.

---

Yamanaka, T., K. Shiraki, K. Sugimoto, T. Ito, K. Fujikawa, et al. (2000). "Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines." Hepatology 32(3): 482-490.

Zerafa, N., J. A. Westwood, E. Cretney, S. Mitchell, P. Waring, et al. (2005). "Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies." Journal of Immunology 175(9): 5586-5590.

Zhou, L., Y. Huang, J. Li and Z. Wang (2010). "The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma." Medical Oncology 27(2): 255-261.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Humane Hepatokarzinogenese .....	9
Abbildung 2:	Vergleich zwischen Nekrose und Apoptose .....	10
Abbildung 3:	Extrinsischer (Todesrezeptor-vermittelter) und intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg der Apoptose .....	12
Abbildung 4:	Design der rekombinanten TRAIL Fusionsproteine .....	15
Abbildung 5:	Hypothese der synergistischen Interaktion von Bortezomib und TRAIL in Neuroblastoma Zellen .....	17
Abbildung 6:	Prinzip des Caspase-Glo 3/7 Assay .....	34
Abbildung 7:	EGF-Rezeptor Färbung auf gesundem und HCC-Lebergewebe .....	37
Abbildung 8:	Durchflusszytometrische Analyse der Hepatoma-Zelllinien und PHH auf EGF-Rezeptor Expression .....	38
Abbildung 9:	Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in PHH und Huh7 .....	39
Abbildung 10:	Caspasen-Aktivierung durch $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in PHH und Huh7 .....	40
Abbildung 11:	Vergleich der Caspasen-Aktivierung induziert durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib .....	41
Abbildung 12:	Kristallviolett-Färbung durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib von PHH und Huh7 .....	42
Abbildung 13:	Western Blot Analyse .....	43
Abbildung 14:	Inhibierung der Caspasen-Aktivität durch neutralisierenden TRAIL-Antikörper in Huh7 .....	44
Abbildung 15:	Inhibierung der Caspasen-Aktivität Pan-Caspase-Inhibitor (QVAD) in Huh7 .....	45
Abbildung 16:	Western Blot Analyse .....	46
Abbildung 17:	Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in gesundem und HCC-Lebergewebe .....	47
Abbildung 18:	Caspasen-Aktivierung durch $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in gesundem und HCC-Lebergewebe .....	48
Abbildung 19:	Vergleich der Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw.	

---

	$\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in gesundem und HCC-Lebergewebe .....	49
Abbildung 20:	RT-PCR von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im gesunden und HCC- Lebergewebe nach Bortezomib-Behandlung .....	50
Abbildung 21:	Spaltung von Cytokeratin-18 nach Apoptose-Induktion durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib im HCC-Lebergewebe .....	51
Abbildung 22:	Immunhistochemischer Nachweis von aktivierter Caspase-3 in gesundem und HCC-Lebergewebe .....	52
Abbildung 23:	Immunhistochemischer Nachweis von durch Caspasen- gespaltenes Cytokeratin-18 in gesundem und HCC-Lebergewebe .....	53
Abbildung 24:	Quantifizierung der Caspase-3 Aktivität und der Cytokeratin-18 Spaltung im HCC-Lebergewebe .....	54
Abbildung 25:	Immunfluoreszenz-Färbung zur Bestimmung der TUNEL-Reaktivität im HCC-Lebergewebe .....	55
Abbildung 26:	Quantifizierung der TUNEL-Reaktivität im HCC-Lebergewebe .....	56
Abbildung 27:	Caspasen-Aktivierung durch scTRAIL bzw. $\alpha$ EGFR-scTRAIL alleine oder in Kombination mit Bortezomib in tumorfreiem und HCC-Lebergewebe .....	57

**Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.bidest	Aqua bidest
AEC	Aminoethylcarbazol
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Differenzierungsantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
BZB	Bortezomib
DAPI	4'6-Diamino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
f	<i>Forward</i> = Vorwärts
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 Phosphat-Dehydrogenase
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonic acid
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse-raddish peroxidase</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
kDa	Kilodalton
l	Liter
mA	Mili-Ampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

---

min	Minuten
Mio	Millionen
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	<i>Reverse</i> = Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> -Tween
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
α	anti
±	Plus/Minus

## Lebenslauf

Name: Kristin Wahl  
Geboren: 22.12.1982 in Sangerhausen  
Adresse: Grünewaldstr. 18  
30177 Hannover  
Nationalität: Deutsch

## Schulbildung

1989-1993 Grundschole Oberröblingen  
1993-2002 Geschwister-Scholl-Gymnasium Sangerhausen; Abitur

## Studium & Diplomarbeit

10/2002- 05/2008 Studium; Studienfach Diplom-Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Thema der Diplomarbeit „Nachweise der THF-Monooxygenase-Aktivität von ThmABCD aus Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans“

## Promotion

07/2008-12/2012 Promotionsstudium in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Thema „Neue therapeutische Strategien für die Apoptose-Induktion im Hepatozellulären Karzinom“

## Wissenschaftliche Tätigkeit

### Stipendien

September 2009: European Cell Death Organisation (ECDO) in Paris, Frankreich

September 2010: European Cell Death Organisation (ECDO) in Gent, Belgien

### Poster

September 2009: European Cell Death Organisation (ECDO) in Paris, Frankreich

September 2010: European Cell Death Organisation (ECDO) in Gent, Belgien

Mai 2010/2011: Gastro-Retreat der Medizinischen Hochschule Hannover, Hermannsburg

November 2010/2011: TRR-SFB 77 Retreat, Fulda

### Vorträge

Mai 2011: Gastro-Retreat der Medizinischen Hochschule Hannover, Hermannsburg

November 2011: TRR-SFB 77 Retreat, Fulda

### Veröffentlichungen

**Wahl K.**, Siegemund M., Lehner F., Nüssler A., Länger F., Krech T., Manns M.P., Schulze-Osthoff K., Pfizenmaier K., Bantel H. „Increased Apoptosis Induction in Hepatocellular Carcinom by Novel Tumor-Targeted Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Fusion Protein in Combination with Bortezomib.” Hepatology 2012

Siegemund M., Pollak N., Seifert O., **Wahl K.**, Hanak K., Vogel A., Nüssler A.K., Göttisch D., Münkel S., Bantel H., Kontermann R.E., Pfizenmaier K. „Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity.” Cell Death & Disease 2012

Joka D., **Wahl K.**, Möller S., Schlue J., Vaske B., Bahr M.J., Manns M.P., Schulze-Osthoff K., Bantel H. „Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis.” Hepatology 2012

Veltkamp C., Anstaett M., **Wahl K.**, Möller S., Gangl S., Bachmann O., Hardtke-Wolenski M., Länger F., Stremmel W., Manns M.P., Schulze-Osthoff K., Bantel H. „Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF $\alpha$  treatment.” Gut 2011

## Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppenleiterin und wissenschaftlichen Mentorin Prof. Dr. Heike Bantel für die Bereitstellung des spannenden Themas, sowie für die freundliche und sachkundige Beratung und Betreuung.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Matthias Hardtke-Wolenski und Dr. Fatih Noyan für die Ratschläge und stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinen Kollegen, die auch Freunde geworden sind, bin ich dankbar für die tolle Zusammenarbeit in jeglicher Hinsicht. Spezieller Dank gilt dabei der „AG Bäcker“.

Ein sehr großer Dank gilt meiner Sarah. Beruflich und vor allem privat bin ich dir zu großem Dank verpflichtet.

Ich danke meiner ganzen Familie, aber besonders meinen Eltern sowie meinem Bruder, seiner Frau und meiner Nichte Marie. Ohne euch und den immensen Rückhalt, den ihr mir ständig gebt, wäre ich heute ganz bestimmt nicht an diesem Punkt in meinem Leben.

Ich danke meinem Freund Mario dafür, dass er mir seit vielen Jahren zur Seite steht und weil er für mich ein ganz besonderer Mensch ist.