

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**Das TRAIL-System:
Therapeutische Relevanz im follikulären
Schilddrüsenkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Inga Johanna Nolten

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Andreas Krieg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Olaf Picker

Meiner Familie, Wolfgang & Elke & Paula Nolten

Herrn Dr. Thomas Artur Werner

I. Zusammenfassung

Die Subpopulation der Schilddrüsenkarzinom-Patienten mit einem metastasierten Radiojod-refraktären follikulären Schilddrüsenkarzinom (FTC) hat mit einer 10-Jahres Überlebensrate von etwa 10 % eine ausgesprochen schlechte Prognose. Speziell für diese Patienten stehen bisher keine adäquaten Therapien zur Verfügung. TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing-ligand*) erlangte Aufsehen durch eine Todesrezeptor-vermittelte selektive Apoptoseinduktion in Tumorzellen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem TRAIL-System in Hinblick auf die prognostische Relevanz und therapeutische Nutzbarkeit im metastasierten Radiojod-refraktären FTC. Besonderes Augenmerk wurde auf die *inhibitor-of-apoptosis proteins* (IAP) als Angriffspunkt zur Steigerung der TRAIL-Wirkung und Überwindung von Resistenzen gelegt. Dazu wurde zunächst die Expression des TRAIL-Proteins und seiner Rezeptoren durch immunhistochemische Färbung von *Tissue micro arrays* mit Proben von 44 Patienten evaluiert und mit klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Überleben korreliert. Es konnte so der nicht-proapoptotische „Fängerrezeptor“ DcR2/TRAIL-R4 als unabhängiger negativer prognostischer Marker identifiziert werden. Außerdem wurde in einer Zelllinie aus einem metastasierten Radiojod-refraktären FTC die Expression des TRAIL-Systems mittels quantitativer *Real Time* PCR und Western Blot nachgewiesen. Anhand von MTS-Assays und *fluorescence activated cell sorting* (FACS) Untersuchungen konnte eine Sensitivität der Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose demonstriert sowie eine Verstärkung der TRAIL-Wirkung im Sinne eines synergistischen, sensitivierenden Effektes durch Zugabe der IAP-Inhibitoren GDC-0152 oder Birinapant erreicht werden. Durch Western Blot Analysen nach Behandlung konnte gezeigt werden, dass diese Sensitivierung vor allem durch eine IAP-Inhibitor induzierte Degradation der Proteine cIAP1 und cIAP2 vermittelt wurde. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die prognostische Bedeutung des TRAIL-Systems im follikulären Schilddrüsenkarzinom demonstriert werden. Unser Modell weist mit der erfolgreichen TRAIL-Behandlung von Zellen eines FTC mit Metastasierung und Radiojod-Resistenz auf eine mögliche therapeutische Nutzbarkeit des TRAIL-Systems hin und der gelungene Ansatz der Kombination mit weiteren Substanzen wie den IAP-Inhibitoren entspricht der aktuellen Entwicklung in der modernen Krebstherapie mit zunehmender Bedeutung der individualisierten Kombination verschiedener Chemotherapeutika zur Ausbeutung der einzelnen Wirkungen bei minimierten Nebenwirkungen. Somit präsentiert diese Arbeit wichtige Erkenntnisse über das TRAIL-System in follikulären Schilddrüsenkarzinomen und kann eventuell als Grundlage weiterer Studien mit dem Ziel der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dienen.

II. Summary

The subpopulation of thyroid cancer patients who have metastasized radioactive iodine (RAI) refractory follicular thyroid cancer (FTC) is confronted with a very poor prognosis and a 10-year overall survival rate of about 10 %. To date, no encouraging second line therapeutic options are available for these patients. TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) gained considerable popularity through a death receptor-mediated selective induction of apoptosis in tumor cells. This work addresses the TRAIL system regarding its prognostic relevance and therapeutic potential in metastasized RAI refractory FTC. A special emphasis was placed on the inhibitor-of-apoptosis proteins (IAP) as potential targets to increase TRAIL sensitivity and to overcome possible cell inherent resistance mechanisms towards TRAIL mediated apoptosis. In a first step, the expression of TRAIL and its receptors was evaluated by immunohistochemical staining of tissue micro arrays with samples of 44 patients and subsequently correlated with clinicopathological variables. The expression of the non- death domain containing decoy receptor DcR2/TRAIL-R4 could be identified as an independent negative prognostic marker in FTC. In addition, we investigated the expression of the members of the TRAIL system in a RAI refractory FTC cell line by quantitative real-time PCR and Western blot analyses. MTS-assays and fluorescence-activated cell sorting (FACS) were used to demonstrate the sensitivity of the FTC cells for TRAIL induced apoptosis. The additional treatment with IAP-inhibitors GDC-0152 or Birinapant induced a synergistic, sensitizing effect enhancing TRAIL induced apoptosis. Western blot analyses revealed that the sensitizing effect was mediated by a compound induced degradation of the cellular IAP1 (cIAP1) and cIAP2. In summary, this study could demonstrate for the first time the prognostic and therapeutic implications of the TRAIL system in FTC. By the effective treatment of a metastasized, RAI refractory FTC cell line with recombinant human TRAIL our model indicates a potential therapeutic usability of the TRAIL system in FTC. The successful approach of a combinational therapy with IAP targeting compounds is consistent with the current development in modern cancer therapy, in which individualized combinations of different chemotherapeutics are used to exploit complementary therapeutic effects by at the same time minimizing harmful side effects. Therefore, this study presents important findings about the TRAIL system in FTC and can serve as a basis for future translational studies with the prospect of developing new therapeutic options.

III. Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Werner TA*, **Nolten I***, Dizdar L, Riemer J, Schütte SC, Verde PE, Raba K, Schott M, Knoefel WT, Krieg A. *IAPs cause resistance to TRAIL-dependent apoptosis in follicular thyroid cancer*. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Jan 9. pii: ERC-17-0479. doi: 10.1530/ERC-17-0479. [Epub ahead of print]

* beide Erstautor

Werner TA, Dizdar L, **Nolten I**, Riemer JC, Mersch S, Schütte SC, Driemel C, Verde PE, Raba K, Topp SA, Schott M, Knoefel WT, Krieg A. *Survivin and XIAP - two potential biological targets in follicular thyroid carcinoma*. *Sci Rep*. 2017 Sep 12;7(1):11383. doi: 10.1038/s41598-017-11426-3

IV. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AIC	Akaike information criterion
Apaf	Apoptotic protease activating factor
BAK	Bcl-2 antagonist killer
BAX	Bcl-2 associated x-protein
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BIR	Baculoviral IAP repeat
BRUCE	BIR-containing ubiquitin conjugating enzyme
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
cDNA	Komplementäre DNA
cFLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
CI	Confidence interval
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
cm	Centimeter
CRC	Colorectal carcinoma
CRD	Cysteinreiche Domäne
C_T	Cycle of threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DcR	Decoy receptor
DD	Death Domain
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DED	Death effector domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DR	Death receptor
DTC	Differntiated thyroid cancer
ED	Erstdiagnose

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszierendes Licht
FP	Fractional product
FSC	Forward scatter
FTC	Follicular thyroid cancer
g	Normalerdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCC	Hepatocellular carcinoma
HR	Hazard Ratio
HRP	horseradish peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IRS	Immunreaktiver Score
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
LA	Lymphadenektomie
M	Median
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MKI	Multikinase-Inhibitoren
ml	Milliliter
MLKL	Mixed lineage kinase-like
mRNA	Messenger RNA
MTC	Medullary thyroid cancer
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MW	Molecular weight
n	Stichprobengröße
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
ND	Neck dissection
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NHL	Non-hodgkin Lymphom
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
nm	Nanometer
NOS	Not otherwise specified
ns	Nicht signifikant
NSCLC	Non-small-cell-lung-cancer
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
<i>p</i>	Probability
PARP	Poly ADP-ribose Polymerase
PAX	Paired box gene
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDTC	Poorly differentiated thyroid cancer
pH	Potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PI3K	Dephosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PLAD	Preligand assembly domain
pmol	Picomol
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors
PS	Phosphatidylserin
PTC	Papillary thyroid cancer
r	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient
RANKL/TRANCE	Receptor Activator of NF- κ B Ligand/ NF-related activation-induced cytokine
REMARK	REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies
Rh	Rekombinant human
RING	Really interesting new gene
RIPK	Receptor interacting protein kinase
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SD	Standard deviation
SDS	Sodium Dodecylsulfat
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP binding protein with low PI
SSC	Side scatter
TBE	TRIS-Borat-EDTA
tBid	Truncated BH3 interacting-domain death agonist
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg	Thyreoglobulin
TM	Transmembrane Domäne
TMA	Tissue micro array
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TPO	Thyreoperoxidase
TRA	TRAIL Rezeptor Antagonist
TRAIL	Tumor necrosis factor-related-apoptosis-inducing-ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TSHR	Thyroidea stimulierendes Hormon Rezeptor
TsIAP	Testis-specific inhibitor of apoptosis protein
UICC	Union internationale contre le cancer
ÜL	Überleben
UTC	Undifferentiated thyroid cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
vs.	Versus
WHO	World Health Organization
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
µg	Mikrogramm
µg	mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

V. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	I
II. Summary	II
III. Publikationen	III
IV. Abkürzungsverzeichnis	IV
V. Inhaltsverzeichnis	VIII
VI. Abbildungsverzeichnis	X
VII. Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Schilddrüsenkarzinome	1
1.2 Das metastasierte Radiojod-refraktäre follikuläre Schilddrüsenkarzinom	6
1.3 Apoptose	8
1.4 Die Signalwege des programmieren Zelltodes	9
1.5 Das TRAIL-System und seine Rolle im programmierten Zelltod	10
1.6 Negative Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose: TRAIL Resistenz	13
1.6.1 Todesrezeptoren.....	14
1.6.2 <i>Decoy</i> -Rezeptoren.....	15
1.6.3 Die Apoptose-inhibitorischen Proteine.....	16
1.7 Therapeutische Regulation der IAPs durch Smac-Mimetika	19
1.8 Das TRAIL-System als therapeutisches Ziel in humanen Karzinomen	20
1.9 Ziele der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Laborgeräte.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Molekularbiologische Kits.....	26
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.6 Oligonukleotide.....	28
2.1.7 Antikörper	30
2.1.8 Software.....	30
2.1.9 Zelllinie.....	31
2.1.10 Gewebeproben	31

2.2 Methoden	32
2.2.1 Zellkultivierung.....	32
2.2.2 Lebendzellzahlbestimmung.....	32
2.2.3 Behandlung der Zellen.....	32
2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay.....	34
2.2.5 Bestimmung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie.....	36
2.2.6 RNA-Isolierung.....	38
2.2.7 Reverse Transkription.....	39
2.2.8 Real Time PCR.....	40
2.2.9 DNA-Isolierung.....	42
2.2.10 DNA-Amplifizierung.....	42
2.2.11 Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.12 DNA-Aufreinigung.....	43
2.2.13 Quantifizierung der Nukleinsäure-Konzentration und Sequenzierung.....	43
2.2.14 Proteinisolierung und Proteinmengenbestimmung.....	44
2.2.15 Vorbereitung der Proteinproben für den Western Blot und SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
2.2.16 Western Blot und Detektion.....	46
2.2.17 Immunhistochemie.....	47
2.2.18 Statistik.....	50
3 Ergebnisse	52
3.1 Die Expression des TRAIL-Systems in follikulären Schilddrüsenkarzinomen	52
3.1.1 Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in Tumor- und Normalgewebe.....	52
3.1.2 Assoziation der Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren mit klinischen Parametern.....	55
3.1.3 Korrelation der TRAIL und TRAIL-Rezeptor Expression mit dem Überleben.....	60
3.2 Das TRAIL-System in der FTC Zelllinie TT2609-C02	65
3.2.1 RNA-Expression des TRAIL-Liganden und seiner Rezeptoren.....	65
3.2.2 Protein-Expression am TRAIL-Signalweg beteiligter Proteine.....	66
3.2.3 Mutationsanalyse der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2.....	67
3.2.4 Wirkung von rh-TRAIL auf FTC Zellen.....	69
3.2.5 Wirkung der IAP-Inhibitoren GDC-0152 und Birinapant auf FTC Zellen.....	71
3.2.6 Wirkung der Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und IAP-Inhibitoren auf FTC Zellen.....	74
3.2.7 Wirkung der IAP-Inhibitoren GDC-0152 und Birinapant auf die Expression der <i>inhibitor-of-apoptosis</i> Proteine.....	79
4 Diskussion	80

4.1 Die Bedeutung des TRAIL-Systems in follikulären Schilddrüsenkarzinomen	80
4.1.1 DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 sind Biomarker für eine schlechte Prognose im follikulären Schilddrüsenkarzinom.....	81
4.1.2 TRAIL induziert Apoptose in FTC Zellen in vitro	85
4.2 Die Rolle der IAPs im follikulären Schilddrüsenkarzinom	88
4.2.1 Smac-Mimetika sensitivieren FTC Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose durch Degradation von cIAP1 und cIAP2.....	89
4.3 Können TRAIL und IAP-Inhibitoren in der Zukunft Einzug in die Therapie des follikulären Schilddrüsenkarzinoms erhalten?	91
4.4 Schlussfolgerung.....	93
VIII. Literaturverzeichnis	95

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Inzidenz- und Sterberate von Schilddrüsenkarzinomen in Deutschland 2	
Abbildung 2: TRAIL, TRAIL-Rezeptoren und der Apoptose-Signalweg.	12
Abbildung 3: Resistenzmechanismen in der TRAIL-vermittelten Apoptose.	14
Abbildung 4: Struktur der <i>Inhibitor-of-Apoptosis Proteins</i>	17
Abbildung 5: Reduktion des MTS-Reagenz.....	35
Abbildung 6: Prinzip der FACS-Analyse.....	37
Abbildung 7: Beispielhaftes FACS-Analyse Ergebnis	38
Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer Blotting-Kammer.....	46
Abbildung 9: Vergleich der Expression in Tumor und Normalgewebe von Patienten mit FTC.	54
Abbildung 10: Expressionslevel von TRAIL-Rezeptoren und ihre Assoziation mit klinisch- pathologischen Parametern im follikulären Schilddrüsenkarzinom.	56
Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurven für Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben bezogen auf den IRS	62

Abbildung 12: Überlebens-Regressionsbaum zur Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Mortalitätsrisiko.	63
Abbildung 13: RNA-Expression des TRAIL-Liganden und seiner Rezeptoren.....	66
Abbildung 14: Proteinexpression von TRAIL-Ligand und -Rezeptoren in TT-2609-C02.	67
Abbildung 15: Proteinexpression der Apoptose-inhibitorischen Proteine in TT-2609-C02.	67
Abbildung 16: Mutationsanalyse des Rezeptors DR4/TRAIL-R1.....	68
Abbildung 17: Zellviabilität von TT2609-C02 nach Behandlung mit rh-TRAIL.....	69
Abbildung 18: Apoptoseraten in TT2609-C02 nach Behandlung mit rh-TRAIL.....	70
Abbildung 19: Zellviabilität nach Behandlung mit GDC-0152.....	71
Abbildung 20: Apoptoseraten nach Behandlung mit GDC-0152.	72
Abbildung 21: Zellviabilität nach Behandlung mit Birinapant.....	73
Abbildung 22: Apoptoseraten nach Behandlung mit Birinapant.	74
Abbildung 23: Zellviabilität nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152.	75
Abbildung 24: Apoptoseraten nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152.....	76
Abbildung 25: Zellviabilität nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und Birinapant.	77
Abbildung 26: Apoptoseraten nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und Birinapant.....	78
Abbildung 27: Expression der IAPs sowie von PARP und seinem Spaltprodukt nach Behandlung mit GDC-0152 oder Birinapant in TT-2609-C02.....	79

VII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome.....	3
Tabelle 2: Primersequenzen für die Real Time PCR	28
Tabelle 3: Primersequenzen für die DNA-Sequenzierung	29
Tabelle 4: Primärantikörper.....	30
Tabelle 5: Sekundärantikörper.....	30

Tabelle 6: Antikörper zur Isotyp-Kontrolle.....	30
Tabelle 7: Konzentrationen der chemischen <i>Compounds</i> für den MTS-Assay	33
Tabelle 8: Konzentrationen der chemischen <i>Compounds</i> für die Kombinationsbehandlung im MTS-Assay	33
Tabelle 9: Konzentrationen der chemischen <i>Compounds</i> für die Durchflusszytometrie	34
Tabelle 10: Konzentrationen der chemischen <i>Compounds</i> für die Proteinisolation	34
Tabelle 11: Real Time PCR Reaktionsbedingungen.....	41
Tabelle 12: Zusammensetzung des Trenngels in Abhängigkeit von der Prozentigkeit.....	45
Tabelle 13: Zusammensetzung des Sammelgels.....	45
Tabelle 14: Übersicht der Primär-Antikörper und ihrer Versuchsbedingungen für den Western Blot.	47
Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Antikörper und ihre Versuchsbedingungen für die Immunhistochemie	49
Tabelle 16: Immunreaktiver Score (IRS) zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	49
Tabelle 17: Patientencharakteristika	53
Tabelle 18: Korrelation zwischen DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen.....	57
Tabelle 19: Korrelation zwischen DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen.....	58
Tabelle 20: Korrelation zwischen TRAIL Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen.	59
Tabelle 21: Korrelationen der Rezeptor-Expressionslevel untereinander.	60
Tabelle 22: Univariate Überlebensanalyse	64
Tabelle 23: Multivariate Überlebensanalyse	64
Tabelle 24: Multivariate Überlebensanalyse nach schrittweiser Variablenauswahl	65
Tabelle 25: Unterschiede der Gesamtoposeraten nach rh-TRAIL-Behandlung.....	71

1 Einleitung

1.1 Schilddrüsenkarzinome

Maligne Schilddrüsentumore sind die häufigsten Karzinome endokriner Organe. In Deutschland machen sie mit jährlich ca. 6.000 Neuerkrankungen 1 - 2 % aller Krebsneuerkrankungen aus und sind damit insgesamt eher seltene Malignome. Im Jahr 2011 erkrankten in Deutschland ca. 1.800 Männer und 4.500 Frauen an Schilddrüsenkrebs. Das entspricht einer Inzidenz von etwa 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner bei den Männern und etwa 9 pro 100.000 bei den Frauen. Frauen sind in Deutschland 2 - 3 mal häufiger betroffen als Männer. Mit einem Anteil von 1,9 % an allen Krebsneuerkrankungen steht das Schilddrüsenkarzinom bei Frauen somit an Stelle 13 der häufigsten Krebserkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter der Männer liegt bei 58 Jahren, das der Frauen bei 52 Jahren [1]. In den USA macht das Schilddrüsenkarzinom laut *National Cancer Institute* etwa 3,4 % aller neuen Krebserkrankungen aus, zwischen 2010 und 2014 betrug dort die Inzidenz bei Männern 7,1 pro 100.000 und bei Frauen 21 pro 100.000 [2]. Auch innerhalb Deutschlands variiert die Erkrankungsrate. So finden sich die meisten Neuerkrankungen in Bayern, was mit ähnlichen Zahlen in Österreich korreliert. Der stärker ausgeprägte Jodmangel in meeresfernen, gebirgigen Regionen führt zu einer Abnahme der Jod-abhängigen Synthese der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (T4). Das dadurch vermehrt produzierte Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) wirkt stimulierend auf das Wachstum der Schilddrüse. Dies kann zur Ausbildung von Strumen führen und somit die Entstehung von Karzinomen begünstigen.

Weltweit, wie auch in Deutschland hat die Inzidenz der Schilddrüsenkarzinome im Zeitraum von 1999 bis 2012 deutlich zugenommen (Abbildung 1). Im Jahr 2000 waren in Deutschland noch ca. 1.200 Männer und 2.800 Frauen neuerkrankt. Für 2016 ging die Prognose des Robert-Koch-Instituts von 2.100 Neuerkrankungen bei den Männern (5,2 pro 100.000) und 5.200 bei den Frauen (12,4 pro 100.000) aus. Diese Entwicklung ist am Ehesten auf die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten zurückzuführen. Die Sterberate hat im selben Zeitraum sowohl für Männer als auch für Frauen leicht abgenommen. Sie ist mit 0,5 % bei beiden Geschlechtern relativ gering. Dies liegt darin

1 Einleitung

begründet, dass die Mehrzahl der Karzinome prognostisch günstige differenzierte Schilddrüsenkarzinome sind und in einem sehr frühen Stadium entdeckt werden.

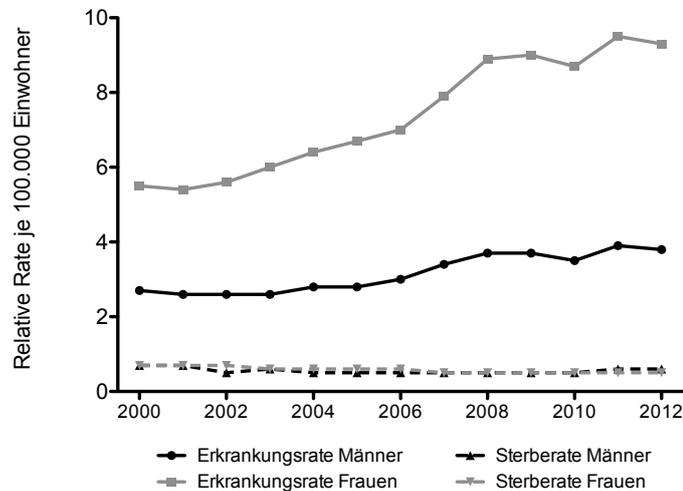


Abbildung 1: Entwicklung der Inzidenz- und Sterberate von Schilddrüsenkarzinomen in Deutschland

Relative Erkrankungs- und Sterberaten von Männern und Frauen je 100.000 Einwohner altersstandardisiert zum Europastandard aus den Jahren 2000 - 2012. Die Daten entstammen dem Robert Koch Institut [3].

Die Schilddrüsenkarzinome umfassen eine histologisch heterogene Gruppe. Die Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome der WHO von 2004 erfolgte nach histologischen Kriterien und Differenzierungsgrad und wurde 2010 durch K.W. Schmid modifiziert (Tabelle 1) [4]. Die grobe Einteilung erfolgt demnach in Karzinome mit Follikel epitheldifferenzierung und Karzinome mit C-Zell-Differenzierung. Die Karzinome mit Follikelzell differenzierung werden nach dem Grad ihrer Differenzierung abgestuft in differenzierte Karzinome (DTC), gering differenzierte Karzinome (PDTC) und undifferenzierte (anaplastische) Karzinome (UTC). Innerhalb der differenzierten Schilddrüsenkarzinome werden anhand morphologischer Merkmale papilläre (PTC) und follikuläre (FTC) Karzinome unterschieden. Ein geringer Anteil zeigt Merkmale beider Formen und lässt sich nicht eindeutig zuordnen. Diese werden als differenzierte Schilddrüsenkarzinome NOS („*not otherwise specified*“) bezeichnet. Das papilläre Schilddrüsenkarzinom kann neben seiner häufigsten konventionellen Form in verschiedenen histologischen Varianten auftreten. Vertreter der Karzinome mit C-Zell-

1 Einleitung

Differenzierung ist vor allem das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC). Ein kleiner Teil weist eine gemischte C-Zell-Follikelzell-Differenzierung auf.

Tabelle 1: Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome

Schilddrüsenkarzinome			
I. Karzinome mit Follikelzellendifferenzierung	A. Differenzierte Karzinome (DTC)	1. Papilläres Karzinom (PTC)	a. Konventioneller Typ b. Varianten
		2. Follikuläres Karzinom (FTC)	a. Minimal-invasiv b. Breit-invasiv
		3. NOS („not otherwise specified“)	
	B. Gering differenzierte Karzinome (PDTC)		
C. Undifferenziertes (anaplastisches) Karzinom (UTC)			
II. Karzinome mit C-Zell-Differenzierung	1. Medulläres Karzinom (MTC)		a. Sporadisch b. hereditär
	2. Gemischte C-Zell-Follikelzell-Differenzierung		
III. Seltene primäre Schilddrüsenkarzinome	Plattenepithelkarzinom; Muzinöses Karzinom; Mukoepidermoides Karzinom mit Eosinophilie; Spindelzelltumor mit thymusähnlicher Differenzierung (SETTLE); Karzinom mit thymusähnlicher Differenzierung (CASTLE)		

Mit über 90 % den größten Anteil machen die differenzierten Schilddrüsenkarzinome aus. 80 - 85 % sind hierbei der Gruppe der papillären Schilddrüsenkarzinome zuzuordnen [5], während die follikulären Schilddrüsenkarzinome 10 - 15 % ausmachen [6]. Medulläre Schilddrüsenkarzinome werden in 5 - 10 % nachgewiesen. Gering differenzierte und undifferenzierte Karzinome machen mit je unter 5 % einen geringen Anteil aus [1].

Die Pathogenese der Schilddrüsenkarzinome ist multifaktoriell und nicht vollständig geklärt. Im letzten Jahrzehnt konnten jedoch neue Erkenntnisse über molekulare Signalwege sowie deren genetische und epigenetische Veränderung das Verständnis der Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen verbessern [5]. Als gesicherter ätiologischer Faktor gilt die Einwirkung ionisierender Strahlen. Vor allem nach Strahlenexposition der Schilddrüse im Kindesalter ist gehäuft mit der Entwicklung eines PTC zu rechnen.

1 Einleitung

Die Latenz zwischen Exposition und Tumorentstehung beträgt bis zu 30 Jahre [7]. Auch die Jodversorgung beeinflusst die Verteilung der verschiedenen Karzinom-Typen. Studien belegen eine Verschiebung zugunsten von FTC und aggressiven UTC in Jodmangelgebieten im Vergleich zu Gegenden mit ausreichender Jodversorgung [8].

Neben diesen exogenen Einflussfaktoren sind zuletzt auch zunehmend genetische Faktoren im Zusammenhang mit der Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen untersucht worden. Mittlerweile sind eine Reihe molekulargenetischer Veränderungen bekannt, welche in Zusammenhang mit der Entstehung von Schilddrüsenkrebs gebracht werden. Eine Punktmutation des Rezeptor-Tyrosinkinase (Ret)- Protoonkogens beispielsweise führt zu einer Rezeptor-Aktivierung, die über komplexe Signalkaskaden Wachstumsvorgänge initiiert und liegt in über 95 % der familiären und in über 40 % der sporadischen MTC vor [9].

Demgegenüber ist die genetische Genese der differenzierten Schilddrüsenkarzinome multifaktoriell und weniger genau bekannt. Verschiedene Mutationen, die vor allem den *desphosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) / Akt Signalweg und den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg betreffen und ebenfalls zu einer vermehrten Expression von Rezeptor-Tyrosinkinasen führen, scheinen eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese einer Vielzahl der differenzierten und anaplastischen Tumore zu spielen [5]. Die so hochregulierten Rezeptor-Tyrosinkinasen besitzen wichtige Funktionen in den Bereichen Zellproliferation, Apoptose-Inhibition, Angiogenese sowie Migration, Adhäsion und Invasion und begünstigen somit das Tumorwachstum.

Der klinische Verdacht auf ein Schilddrüsenkarzinom beruht häufig auf der palpatorischen oder sonografischen Entdeckung von Schilddrüsenknoten oder vergrößerten Halslymphknoten. Klinische Symptome fehlen häufig und sind meist erst durch lokal-verdrängendes Wachstum bedingt. So können neben palpablen Knoten Schluckbeschwerden, Stridor, Heiserkeit, Horner-Syndrom oder eine Einflusstauung auftreten. Wegweisend für die Diagnose sind meist Sonografie und Szintigrafie der Schilddrüse. Mittels Sonografie werden Ausdehnung und Struktur von Raumforderungen beurteilt, außerdem können extrathyreoidale Veränderungen wie vergrößerte Lymphknoten diagnostiziert werden. Durch die Szintigrafie können Schilddrüsentumore funktionell anhand der Radionuklid-Anreicherung unterschieden werden. Klassischerweise präsentieren sich Schilddrüsenkarzinome als sonografisch echoarme, szintigrafisch kalte Knoten. Eine Feinnadelaspirationszytologie (FNP) kann

1 Einleitung

ein Malignom bestätigen, es mit einer Sensitivität von ca. 90 % jedoch nicht sicher ausschließen. Aufgrund der Möglichkeit falsch negativer Befunde in der FNP ist bei fortbestehendem Malignomverdacht die operative Resektion mit nachfolgender histologischer Untersuchung indiziert. Bei Nachweis eines Karzinoms sind weitere Staginguntersuchungen zum Ausschluss von Metastasen zwingend erforderlich [10].

Die Therapie von Schilddrüsenkarzinomen ist abhängig von ihrer histologischen Entität und unterscheidet sich grundlegend. Wichtigste therapeutische Maßnahme ist grundsätzlich die operative Resektion, während weitere Therapieoptionen abhängig von der Jod-Speicherfähigkeit der Tumore sind. Für Jod-speichernde differenzierte Schilddrüsenkarzinome empfiehlt die Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) zur operativen Therapie maligner Schilddrüsenerkrankungen vom November 2012 die radikale Thyreodektomie mit anschließender ablativer Radiojodtherapie sowie TSH-suppressiver Schilddrüsenhormonsubstitution. Dabei wird extrakapsulär das gesamte Schilddrüsengewebe reseziert. Bei dem Verdacht auf Lymphknotenmetastasen werden ebenfalls die zervikozentralen sowie stadienabhängig auch die zervikolateralen Lymphknoten entfernt. Lediglich bei einem nicht-metastasierten, nicht-organüberschreitenden papillären Mikrokarzinom ≤ 1 cm sowie bei einem solitären minimal-invasiven follikulären Karzinom ohne Angioinvasion kann eine Hemithyreodektomie ausreichend sein. 2 - 3 Wochen postoperativ erfolgt bei den Jod-speichernden differenzierten Karzinomen die ablative Radiojodtherapie mit hochdosiertem ^{131}Jod in mehreren Fraktionen, bis szintigrafisch kein Jod-speicherndes Gewebe mehr nachgewiesen werden kann. Im Anschluss daran wird durch lebenslange hochdosierte Thyroxin-Substitution der TSH-Spiegel supprimiert, um dessen stimulierenden Effekt auf eventuell noch vorhandenes Tumorgewebe und Metastasen zu minimieren. Undifferenzierte, sowie medulläre Schilddrüsenkarzinome nehmen nicht am Jodstoffwechsel teil und sind daher nicht sensibel für die Radiojodtherapie. Hier stehen die radikale Resektion, externe Bestrahlung sowie adjuvante Chemotherapien im Fokus.

Die Prognose maligner Schilddrüsentumore ist vor allem abhängig von der histologischen Entität. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 88 % bei Männern und 93 % bei Frauen ist sie insgesamt günstig. Eine Ausnahme bilden die selteneren medullären Schilddrüsenkarzinome mit 50 % Überleben nach 10 Jahren sowie die

1 Einleitung

prognostisch sehr ungünstigen anaplastischen Schilddrüsenkarzinome mit einem mittleren Überleben von etwa 6 Monaten. Während diese nur einen äußerst geringen Anteil der Schilddrüsenkarzinome ausmachen, sind sie verantwortlich für einen Großteil der Schilddrüsenkarzinom-assoziierten Mortalität. DTC weisen mit einem 10-Jahres-Überleben von über 90 % beim PTC und etwa 75 % beim FTC insgesamt eine sehr gute Prognose auf. Diese ist neben dem Alter der Patienten bei Diagnose [11] vor allem bestimmt durch die Speicherfähigkeit für Jod sowie das Vorliegen von Fernmetastasen [12].

1.2 Das metastasierte Radiojod-refraktäre follikuläre Schilddrüsenkarzinom

Mit durchschnittlich 10 - 15 % aller Schilddrüsenkarzinome ist das FTC das zweithäufigste Malignom der Schilddrüse. Bei einem Erkrankungsgipfel um das 50. Lebensjahr erkranken die Patienten mit FTC später im Vergleich zu einem durchschnittlichen Erkrankungsalter unter 40 Jahren beim PTC [10]. Die mit einem 10-Jahres-Überleben von 75 % insgesamt günstige Prognose der FTC verschlechtert sich signifikant durch das Auftreten von Fernmetastasen. Eine Fernmetastasierung reduziert die 10-Jahres-Überlebensrate auf nur noch 25 - 42 % [12]. Die Metastasierung erfolgt beim FTC vor allem hämatogen in Lunge (35 %) und Skelett (36 %) [13]. Die Therapie der Wahl beim metastasierten differenzierten Schilddrüsenkarzinom ist nach Ausschöpfung chirurgischer Möglichkeiten weiterhin die systemische Radiojodtherapie mit anschließender TSH-suppressiver Schilddrüsenhormon-Substitution [14]. Etwa zwei Drittel aller metastasierten differenzierten Schilddrüsenkarzinome entwickeln im Verlauf jedoch eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit ¹³¹Jod. Diese Patienten haben mit einer noch geringeren 10-Jahres-Überlebensrate von 10 % eine ausgesprochen schlechte Prognose. Wesentliches Problem ist, dass die Effektivität der aktuellen Möglichkeiten der Zweitlinientherapie weit hinter der Radiotherapie zurückbleibt [13].

Erkenntnisse über an der Karzinogenese beteiligte molekulargenetische Veränderungen erweitern das Feld möglicher Zielstrukturen und ermöglichen derzeit die Entwicklung neuer alternativer Therapieansätze auch für die fortgeschrittenen Schilddrüsenkrebserkrankungen. Speziell beim follikulären Schilddrüsenkarzinom werden Mutationen des Ras-Gens (v.a. NRAS) in 40 - 50 % [15, 16], PAX8-PPAR γ -

1 Einleitung

Translokationen in 30 - 35 % und PIK3CA-Mutationen in 10 - 30 % beobachtet [17]. Diese führen zur Überaktivierung des PI3K/Akt-Signalweges sowie des MAPK-Signalweges. Die Folge ist eine hochregulierte Expression von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK). Dazu gehören z.B. die VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Rezeptoren (VEGFR), die in verschiedenen Tumoren überexprimiert werden und insbesondere eine Rolle bei der Tumor-Angiogenese spielen und so das Tumorstadium fördern [18]. Auf der Hemmung dieser RTK beruht eine Reihe neuer Substanzen zur zielgerichteten Therapie des metastasierten Radiojod-refraktären Schilddrüsenkarzinoms, die Multikinase-Inhibitoren (MKI). In Europa zugelassen sind Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006, EU-Zulassung 2014) und Lenvatinib (E7080, EU-Zulassung 2015), nachdem für beide in Phase 3 Studien eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden konnte [19-22]. Eine Vielzahl weiterer Medikamente wie Pazopanib, Vandetanib, Cabozantinib und Axitinib sind bereits für die Therapie anderer Malignome zugelassen und werden aktuell in Studien auf Wirksamkeit und Verträglichkeit beim Radiojod-refraktären DTC getestet [23-26].

Als weiteres therapeutisches Ziel wird die Überwindung der Resistenz gegenüber der Radiojod-Therapie angestrebt. Diese beruht auf einem Verlust der NIS (Natrium-Iodid-Symporter) vermittelten Speicherfähigkeit für Radiojod. Zum Verlust der Radiojod-Speicherfähigkeit führt eine Beeinträchtigung bzw. der Verlust der Expression von Jod-verarbeitenden Genen wie NIS, TSH-Rezeptor (TSHR), Thyreoperoxidase (TPO) und Thyreoglobulin (Tg) durch Aktivierung des MAPK-Signalwegs [27, 28]. Für den MEK-1/2 Inhibitor Selumetinib konnte in ersten Studien eine signifikant verbesserte Radiojod-Aufnahme in die Metastasen mit dadurch erreichten Teilremissionen nach erneuter Radiojodtherapie nachgewiesen werden [29].

Insgesamt ist also aktuell eine positive Entwicklung der therapeutischen Optionen für Patienten mit fortgeschrittenen follikulären Schilddrüsenkarzinomen, welche nicht auf eine Radiojodtherapie ansprechen, zu verzeichnen. Es ist allerdings anzumerken, dass Studien für alle MKI bisher lediglich eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und Teilremissionen belegen konnten. Bisher konnte noch für kein Medikament eine Komplettremission oder ein verlängertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden [12]. Erwähnt werden muss auch das teils beträchtliche Nebenwirkungsprofil, welches in den oben erwähnten Studien bei einigen Patienten zum Abbruch der Therapie geführt hat. Es ist also weiterhin von klinischem Interesse,

1 Einleitung

mögliche alternative therapeutische Zielstrukturen zu untersuchen, um die Grundlage für die Entwicklung neuer sicherer Medikamente zu schaffen.

1.3 Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch *Apoptose* genannt beschreibt ein genetisch vermitteltes kontrolliertes Absterben von eukaryotischen Zellen ohne immunologische Begleitreaktion. Erstmals beschrieben wurde sie 1972 durch Kerr *et al.* [30]. Jede Zelle besitzt einen solchen physiologischen Selbstzerstörungsmechanismus. Er kann durch externe Einflüsse ausgelöst werden (z.B. bei der Immunantwort) oder durch zellinterne Signale initiiert werden (z.B. bei irreparablen DNA-Schäden). Physiologischerweise erfüllt die Apoptose Aufgaben im Rahmen der Embryogenese, der Elimination entarteter oder potentiell schädlicher Zellen, der Kontrolle der Zellzahl und damit der Gewebegröße (Gewebehomöostase) sowie der Selektion genetisch intakter Keimzellen. Diese zentrale Funktion im Zellstoffwechsel legt nahe, dass Störungen der Apoptose-Signalwege auch in vielen pathologischen Entwicklungen eine Rolle spielen [31]. So führt eine Apoptosehemmung dazu, dass sich Zellen mit defekter DNA solchen Regulationsmechanismen entziehen können. Die dadurch bedingte Steigerung der zellulären Überlebensrate kann zur Entartung von Zellen oder zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen. Maligne entartete Zellen weisen zudem Resistenzmechanismen gegenüber Apoptose-Signalwegen auf und entziehen sich so dem programmierten Zelltod. Dies führt zum einen zu unkontrolliertem Wachstum der entarteten Zellen mit entsprechendem Aufbruch der Gewebehomöostase, zum anderen können die Zellen auch eine Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Medikamenten wie Chemotherapeutika entwickeln. Entsprechend zentral ist die Bedeutung der Apoptose in der Krebstherapie.

Morphologisch zeichnet sich die Apoptose vor allem durch eine Abrundung und Zellschrumpfung aus. Dieser folgt das Herauslösen der apoptotischen Zelle aus dem Zellverband und die Chromatin-Kondensation. Anschließend kommt es zum Verlust der Kernmembran und zur Fragmentierung des Zellkerns, diese Fragmente werden als Apoptosekörperchen abgeschnürt. Die Zellmembran bleibt dabei intakt. Sie bildet kleine Blasen und exprimiert Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche, wodurch die apoptotische Zelle von Makrophagen oder Nachbarzellen erkannt und phagozytiert werden kann [30, 32].

1 Einleitung

Hiervon abzugrenzen ist die Nekrose. Bei diesem pathologischen Zelluntergang kommt es durch externe schädigende Einflüsse direkt zum Verlust der Integrität der Zellmembran mit folgendem Zellschwellen und Zerplatzen sowie einer dadurch ausgelösten umgebenden Entzündungsreaktion.

Verschiedene Einflüsse können über unterschiedliche Signalwege den programmierten Zelltod initiieren. Direkte Zellschädigung durch Toxine, Strahlung, Hypoxie oder Radikale sowie spezifische Signale durch Bindung spezieller Liganden oder die Abgabe von Granzym B durch zytotoxische T-Zellen können die intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen, welche zur Apoptose führt.

1.4 Die Signalwege des programmierten Zelltodes

Zwei Hauptsignalwege können nach Aktivierung in eine gemeinsame Endstrecke mit dem Ziel der Initiierung von Effektor-Caspasen münden. Unterschieden werden der extrinsische Rezeptor-vermittelte und der intrinsische mitochondriale Weg [33]. Der intrinsische Weg wird initiiert durch verschiedene Arten zellulären Stresses, wie DNA-Schäden, ausgelöst z.B. durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung. Diese Stresssignale führen zur Öffnung transmembranärer Poren in den Mitochondrien und damit zu einer gesteigerten Membran-Permeabilität für apoptotische Proteine wie Cytochrom c und *second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac), welche ins Zytosol freigesetzt werden. Über die Bildung eines Komplexes von Cytochrom c mit *apoptotic protease activating factor 1* (apaf1) wird die Procaspase-9 zu Caspase-9 und damit die nachfolgende Caspase-Kaskade aktiviert. Das ebenfalls freigesetzte Smac hemmt gleichzeitig der Apoptose entgegenwirkende Proteine aus der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis proteins*) [34, 35].

Der zweite Signalweg des programmierten Zelltodes ist der Todesrezeptor (DR = *death receptor*) -vermittelte extrinsische Weg. Dabei lösen Liganden der *tumor necrosis factor* (TNF)-Familie durch Bindung an membranständige Rezeptoren aus der Familie der TNF-Rezeptoren (TNFR) die zur Apoptose führende Signalkaskade mit Caspasen-Aktivierung aus [36]. Bislang wurden 19 zur TNF-Familie gehörende Liganden sowie 29 TNF-Rezeptoren identifiziert [37, 38]. Bei den Liganden der TNF-Familie handelt es sich um Typ-2-transmembranäre Proteine, die in Form von Homotrimeren vorliegen und von welchen durch Proteinasen das aktive lösliche, ebenfalls meist homotrimerisierte Protein abgespalten wird [39]. Die Rezeptoren sind Typ-1-

1 Einleitung

Transmembranproteine, gemeinsames Merkmal ist das Vorhandensein von Cysteinreichen Domänen (CRD) im extrazellulären Bereich. 6 der 29 Rezeptoren besitzen außerdem eine 45 Aminosäuren lange intrazelluläre Todesdomäne (DD = *death domain*), welche für die Signaltransduktion des Apoptosesignals essenziell ist: DR1 (auch TNFR1), DR2 (auch Fas), DR3, DR4, DR5 und DR6. Einige kommen in fast allen Zelltypen des menschlichen Organismus vor, was ihre vielgestaltigen Funktionen unterstreicht [40, 41].

Die beiden Signalwege sind nicht als streng voneinander getrennte Systeme zu betrachten, vielmehr kommt es zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg an vielen Punkten zu Interaktionen und Regulationen [42, 43].

Neben der Apoptose wird seit einigen Jahren eine weitere Form des programmierten Zelltodes diskutiert: die Nekroptose oder programmierte Nekrose. Dabei kommt es über Todesrezeptoren vermittelt zur Induktion einer Signalkaskade, welche anstelle der Caspasen-vermittelten Apoptose über andere Mediatoren einen Zelltod mit den morphologischen Charakteristika der Nekrose auslöst [44-46].

1.5 Das TRAIL-System und seine Rolle im programmierten Zelltod

Der *TNF-related-apoptosis-inducing-ligand* (TRAIL, Apo2L) wurde von Pitti *et al.* [47] und Wiley *et al.* [48] aufgrund seiner Sequenz-Homologie zu FasL/Apo1L und TNF als Mitglied der TNF-Familie identifiziert. TRAIL bindet an fünf verschiedene zur TNFR-Familie gehörenden Rezeptoren: Die membrangebundenen Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 [49], DR5/TRAIL-R2 (KILLER, TRICK2) [40], DcR1/TRAIL-R3 [50] und DcR2/TRAIL-R4 [51, 52] sowie den in löslicher Form vorliegenden Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) [53]. Von DR5/TRAIL-R2 existieren 2 alternative Spleißvarianten, TRICK2A und TRICK2B, welche beide TRAIL binden und die Signalkaskade initiieren können [54]. Die Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 lösen nach TRAIL-Bindung eine intrazelluläre Signalkaskade mit dem Endpunkt der Apoptose aus. Die Fänger-Rezeptoren (DcR = *decoy* Rezeptoren) DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 sowie OPG binden TRAIL, ohne das Apoptosesignal weiterzuleiten. Die herausragende Besonderheit der TRAIL-vermittelten Apoptose ist die Tatsache, dass sie spezifisch in Tumorzellen, nicht aber in normalen Zellen ausgelöst werden kann [55]. Dieser Umstand macht das TRAIL-System so interessant als mögliche therapeutische Zielstruktur in Karzinomen.

1 Einleitung

In Northern Blot Analysen wurde TRAIL-mRNA nach der Entdeckung des TRAIL-Systems in einer Vielzahl verschiedener humaner Gewebe wie Milz, Leber, Lunge, Prostata, Gehirn und Hoden sowie in Tumorzelllinien nachgewiesen [47, 48]. Für die Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 wurde eine starke Expression sowohl in Normalgewebe als auch in Tumorgewebe *in vitro* und *in vivo* postuliert [40, 49]. Die mRNA-Expression des antagonistischen Rezeptors DcR1/TRAIL-R3 schien gering und auf wenige nicht-entartete Gewebe beschränkt zu sein [50, 56], während DcR2/TRAIL-R4 wiederum in zahlreichen humanen Geweben und Tumorzelllinien nachgewiesen wurde [51]. In aktuellen Arbeiten wird eine weite Protein-Expression der TRAIL-Rezeptoren in entarteten und nicht-entarteten Geweben mit teils sehr unterschiedlichen Expressionsmustern in den verschiedenen Tumoren berichtet [57-60].

Das humane TRAIL-Protein besteht aus 281 Aminosäuren und gehört zu den Typ-2-Transmembranproteinen mit einer kurzen intrazellulären Domäne aus nur 17 Aminosäuren. Die extrazelluläre Carboxy-terminale Domäne (Aminosäuren 114-281) bildet nach Spaltung durch Proteinasen das lösliche TRAIL-Molekül, welches als Homotrimer an seine Rezeptoren bindet [61, 62]. Das TRAIL-Gen ist auf Chromosom 3 in der Position 3q26 lokalisiert. Es existieren 3 Spleißvarianten von TRAIL, TRAIL- α , - β und - γ , welche sich in der Trunkierung ihrer extrazellulären Domäne und somit in ihrem proapoptotischen Potential unterscheiden [63]. Die Gene aller Rezeptoren sind auf Chromosom 8 in der Position 8p21 lokalisiert. Sie gehören zu den Typ-1-Transmembranproteinen und verfügen über die für TNFR typischen cysteinreichen Domänen im extrazellulären Bereich [50, 51, 64]. Die hoch homologen Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 weisen zusätzlich eine intrazelluläre DD auf. Durch Bindung des Liganden kommt es zur Rezeptor-Trimerisierung und über die Rekrutierung von *Fas-associated protein with death domain* (FADD) durch die DD zur Bildung des *death-inducing signaling complex* (DISC) [65]. Über seine *death effector domain* (DED) bindet FADD wiederum die DED der Pro-Caspasen 8 und 10 und spaltet diese zu ihren aktiven Formen. Die Caspasen 8 und 10 werden in Form von Homodimeren aus dem DISC entlassen. Caspase 8, welche zu den Initiator-Caspasen gehört, aktiviert die Effektor-Caspase 3, welche über die Rekrutierung verschiedener Substrate den Zelltod umsetzt. Außerdem setzen Caspase 8 und 10 über die Spaltung von *BH3 interacting-domain death agonist* (Bid) mit konsekutiver Aktivierung von *Bcl-2 associated x-protein* (BAX) und *Bcl-2 antagonist killer 1* (BAK) den mitochondrialen

1 Einleitung

intrinsischen Apoptoseweg in Gang, welcher über die Initiator-Caspase 9 ebenfalls in der Aktivierung der Effektor-Caspase 3 mündet [66] (Abbildung 2).

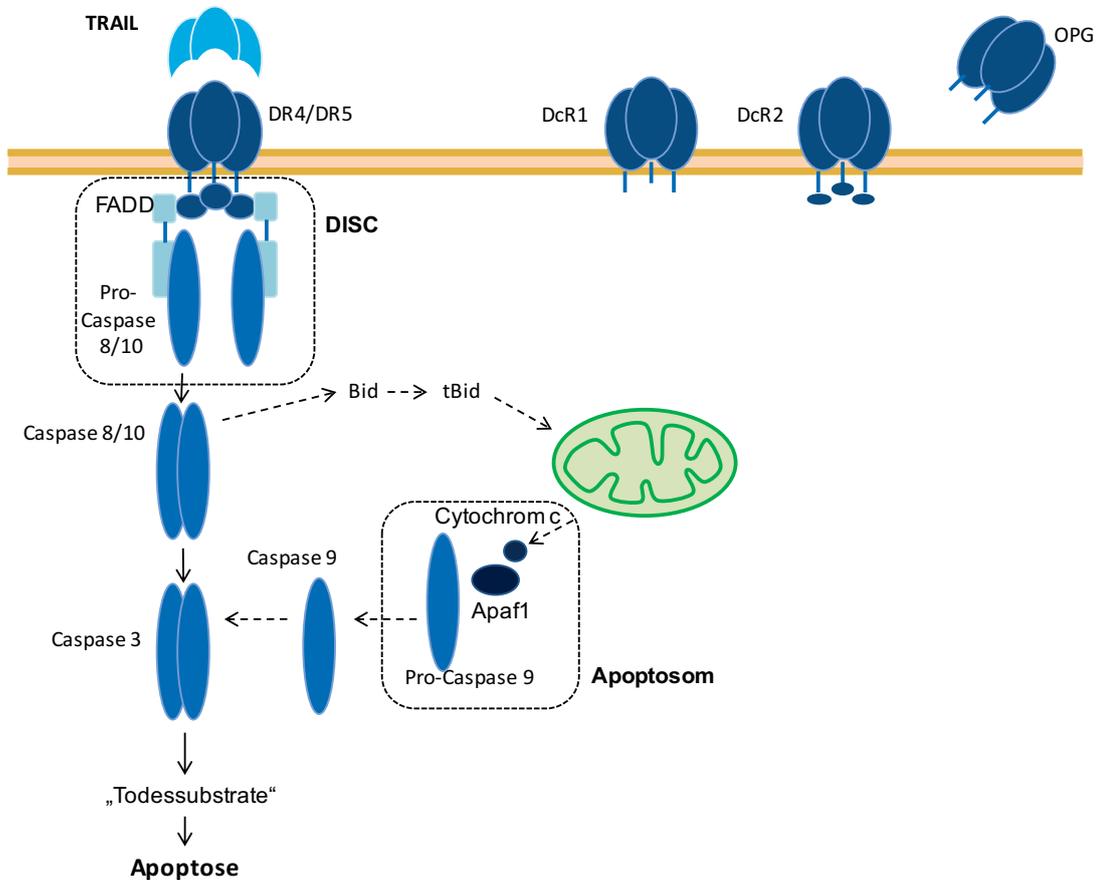


Abbildung 2: TRAIL, TRAIL-Rezeptoren und der Apoptose-Signalweg.

TRAIL bindet an fünf Rezeptoren, die Todesrezeptoren (DR = *death receptor*) DR4 und DR5, die *decoy*-Rezeptoren DcR1 und DcR2 sowie den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin (OPG). Über Bindung an die trimerisierenden Todesrezeptoren DR4 und DR5 induziert er die Apoptose-Signalkaskade. Durch die Rekrutierung von *Fas-associated protein with death domain* (FADD) kommt es zur Ausbildung des *death-inducing signaling complex* (DISC) mit konsekutiver Aktivierung der Caspasen 8 und 10. Diese wiederum aktivieren die Effektorcaspase 3, welche die Apoptose initiiert. Außerdem können aktivierte Caspase 8 und 10 die Spaltung von *BH3 interacting-domain death agonist* (Bid) zu *truncated Bid* (tBid) katalysieren und somit den mitochondrialen Apoptose-Signalweg aktivieren. Über Freisetzung von Cytochrom c gemeinsam mit *Apoptotic protease activating factor 1* (apaf1) wird Caspase 9 aktiviert, welche dann ebenfalls Caspase 3 aktiviert.

In Abwesenheit oder nach Inaktivierung von Caspasen kann TRAIL, ebenso wie FasL und TNF- α , nach Bindung an die DR4/5 und Ausbildung des DISC einen weiteren zum Zelltod führenden Signalweg aktivieren, die programmierte Nekrose, auch Nekroptose genannt [67]. Es wird angenommen, dass ein Komplex aus *receptor interacting protein*

1 Einleitung

kinase (RIPK)-1 und RIPK-3 entsteht [44, 68, 69], das sogenannte Nekrosom, welches die Pseudokinase *mixed lineage kinase-like* (MLKL) rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert [70, 71]. Dillon und Oberst *et al.* konnten dies durch Auslösung einer TNF-induzierten Nekrose bei einem Funktionsverlust des FADD-cFLIP-Caspase 8 Komplexes in Anwesenheit von RIPK3 bestätigen [72, 73]. Der genaue Mechanismus, welcher letztendlich den Zelltod auslöst ist noch nicht abschließend geklärt, doch Studien legen nahe, dass MLKL oligomerisiert und an die Plasmamembran transloziert, wo es durch Aktivierung weiterer Substrate und Membranpermeabilisierung die Umsetzung der Nekroptose induziert [70, 74-76].

Die *decoy*-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 sowie der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) binden ebenfalls TRAIL, lösen intrazellulär aber keine zum Zelltod führende Signalkaskade aus. Sie konkurrieren somit kompetitiv mit den Todesrezeptoren um die Ligandenbindung.

1.6 Negative Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose: TRAIL Resistenz

Trotz der vielversprechenden Eigenschaften des TRAIL-Signalweges als therapeutisches Ziel vieler Krebserkrankungen sind die klinischen Ergebnisse bisher eher enttäuschend. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass viele Tumor-Zelllinien primär resistent gegenüber TRAIL sind oder im Verlauf resistent werden [77]. Die TRAIL-vermittelte Apoptose kann auf vielen Ebenen der Signaltransduktion reguliert werden. Eine Reihe von Proteinen ist in der Lage, hemmend einzugreifen und so die Apoptose zu verhindern bzw. die Sensitivität herabzusetzen. Diese Mechanismen können zur Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber dem TRAIL-induzierten Zelltod beitragen. Sie könnten aber auch therapeutisch genutzt werden, um die Empfindlichkeit von Tumorzellen für TRAIL zu steigern und so neue Behandlungsmöglichkeiten zu schaffen. Im Folgenden wird näher auf die Regulierung auf Rezeptorebene sowie durch die Familie Apoptose-inhibitorischer Proteine eingegangen (Abbildung 3).

1 Einleitung

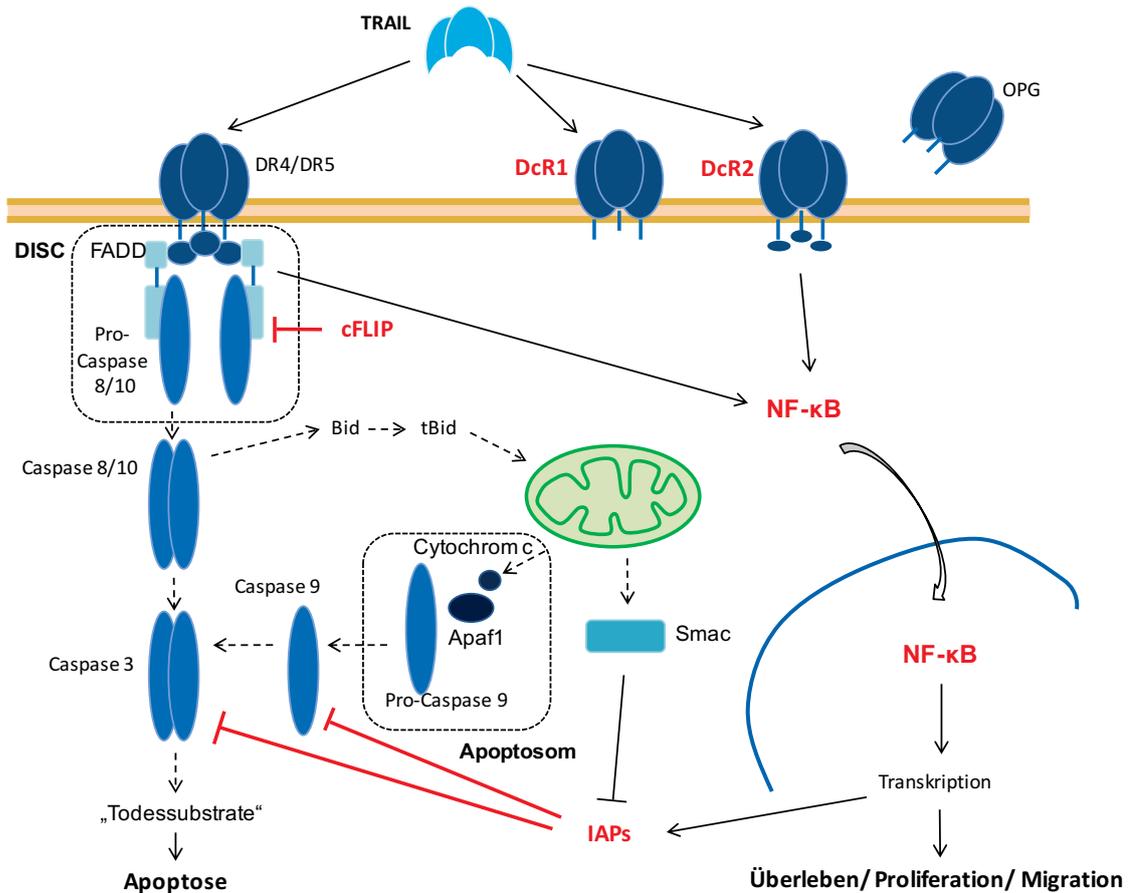


Abbildung 3: Resistenzmechanismen in der TRAIL-vermittelten Apoptose.

Neben der Induktion der Apoptose kann durch TRAIL-Bindung an die Todesrezeptoren (DR) unter bestimmten Voraussetzungen auch eine Induktion überlebensfördernder Kinasen wie NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) vermittelt werden. Die *decoy*-Rezeptoren DcR1 und DcR2 können außerdem TRAIL abfangen und somit die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose verhindern. DcR2 kann darüber hinaus die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern induzieren. IAPs (*Inhibitor-of-Apoptosis Proteins*) können die Caspasen 3 und 9 hemmen und somit die Umsetzung der Apoptose verhindern. Das Protein cFLIP (*cellular FLICE-Inhibitory Protein*) verhindert die Ausbildung des DISC und somit die Aktivierung der Caspasen 8 und 10. Die IAPs werden ihrerseits gehemmt durch das aus den Mitochondrien freigesetzte Protein Smac/DIABLO (*Second mitochondria activator of caspases/ Direct IAP binding protein with low PI*).

1.6.1 Todesrezeptoren

Die erste Möglichkeit von Tumorzellen zur Regulierung des TRAIL-Signals ist die Expression der TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Stärke der Expression der Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 korreliert mit der Sensitivität der Zelle für die TRAIL-vermittelte Apoptose. So konnte eine Assoziation zwischen der Herunterregulation dieser Rezeptoren und steigender Resistenz gegenüber TRAIL gezeigt werden [41, 78, 79]. Dieser Zusammenhang wurde

1 Einleitung

bestätigt durch Studien, welche eine Überwindung der TRAIL-Resistenz bzw. eine Sensitivierung für TRAIL durch Hochregulierung von DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 zeigen konnten [80-82].

Die Expression der DR-Gene kann auf Transkriptions-Ebene reguliert, sowie durch Mutationen beeinflusst werden [83, 84]. Es wurden weiterhin gehäuft verschiedene Mutationen der Todesrezeptoren identifiziert, welche wahrscheinlich durch Verlust der Fähigkeit zur Ligandenbindung bzw. zur DISC-Formierung teilweise mit erhöhtem Krebsrisiko assoziiert sind [85, 86].

Auch verschiedene post-transkriptionelle Prozesse beeinflussen die Protein-Expression der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 und somit die Weiterleitung des Apoptose-Signals durch TRAIL [79, 87, 88]. Neben der Bildung des DISC mit daraus resultierender Apoptose-Induktion kann außerdem ein alternativer Komplex gebildet werden, welcher über die Aktivierung verschiedener Kinasen antiapoptotische Signale initiiert, die Zellüberleben und Proliferation fördern. Dazu gehören beispielsweise NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) [40, 82] und MAP-Kinasen wie *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) [89], p38 [90, 91] und *Extracellular-signal Regulated Kinase-1* und *-2* (ERK1/2) [92]. Die *Receptor Interacting protein Kinase 1* (RIPK1) scheint in der Initiierung dieses Signalwegs eine wichtige Rolle zu spielen, die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig geklärt und aktuell Gegenstand der Forschung.

1.6.2 Decoy-Rezeptoren

Die Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2, welche die intrazelluläre Apoptose-Signalkaskade in Gang setzen wird unter anderem bestimmt durch die zwei weiteren membrangebundenen Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 sowie den löslichen Rezeptor OPG [51, 53, 56]. Die „Fänger“-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 weisen in ihrer extrazellulären cysteinreichen Domäne eine hohe Homologie mit den Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 auf und sind so in der Lage, TRAIL kompetitiv zu binden. Während DcR1/TRAIL-R3 keine intrazelluläre Todesdomäne besitzt, verfügt DcR2/TRAIL-R4 lediglich über eine trunkeerte nicht-funktionelle zytosolische Domäne, die keine Apoptose auslösen, aber den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann [51]. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher nach seiner Aktivierung schnell in den Zellkern

1 Einleitung

transloziert und dort unter anderem die Transkription antiapoptotischer und überlebensfördernder Proteine induziert [93, 94]. Somit wirken die beiden *decoy*-Rezeptoren neutralisierend bzw. antagonistisch zu den signaltransduzierenden Todesrezeptoren. Der fünfte TRAIL-Rezeptor, Osteoprotegerin (OPG) ist ein TNFR-Homolog, welcher *in vivo* den Liganden RANKL/TRANCE (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand/ TNF-related activation-induced cytokine*) bindet und eine Hemmung der Osteoklastogenese bewirkt [53]. TRAIL bindet ihn mit schwächerer Affinität und kann so die Osteoklasten-hemmende Wirkung von OPG blockieren. Es wird eine antagonisierende Funktion in der Regulierung der apoptoseinduzierenden TRAIL-Wirkung durch die Bindung des Liganden angenommen, welcher somit nicht mehr für die Wirkung an den Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 zur Verfügung steht [95].

Tatsächlich wird eine verstärkte Expression dieser drei „Fänger“-Rezeptoren in Tumorgewebe verschiedener Malignome beobachtet. Sowohl für Prostata-Karzinome [96] als auch für Mamma-Karzinome [57] konnte gezeigt werden, dass DcR2/TRAIL-R4 in Tumorgewebe signifikant höher exprimiert wird, was insgesamt mit einer schlechteren Prognose korreliert. Lalaoui *et al.* zeigten gesteigerte Zellproliferation und Tumorstadium durch DcR2/TRAIL-R4 Expression, vermittelt durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges [97]. In malignen Zellen der akut myeloischen Leukämie konnten ähnliche Ergebnisse für DcR1/TRAIL-R3 erzielt werden [98]. In überexprimierten Modellen konnte gezeigt werden, dass DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 in der Lage sind, zum Beispiel über Kooperation mit cFLIP TRAIL-induzierte Apoptose zu inhibieren [99, 100].

1.6.3 Die Apoptose-inhibitorischen Proteine

Eine wichtige Rolle in der Regulation des TRAIL-Signals spielt eine Reihe von Proteinen mit hoher Homologie, welche die Signalkaskade vor allem über Bindung und Inaktivierung von Caspasen hemmen können, die sogenannte *Inhibitor-of-Apoptosis Protein* (IAP) Familie [101]. Die IAPs sind charakterisiert durch den Besitz von bis zu drei der 70-80 Aminosäuren langen *baculoviral IAP repeat* (BIR) Domänen. Außerdem weisen die meisten von ihnen eine RING (*really interesting new gene*) Zinkfingerdomäne am carboxyterminalen Ende oder eine andere Domäne für die Interaktion mit Proteinen auf [102].

1 Einleitung

Aktuell sind insgesamt acht IAPs identifiziert (Abbildung 4). Zu den am besten untersuchten Mitgliedern der IAP-Familie gehören die Proteine *X-linked Inhibitor of Apoptosis* (XIAP/ MIHA/ hILP/ BIRC4/ ILP-1), *cellular IAP-1* (cIAP1/ hIAP2/ MIHB/ BIRC2), *cellular IAP-2* (cIAP2/ hIAP1/ MIHC/ API2/ BIRC3) und Survivin (TIAP/ BIRC5) [103-106]. Die weiteren Mitglieder sind *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein* (NAIP) [107], *Testis-specific IAP* (TsIAP/ hILP2/ BIRC8/ ILP-2) [108], *BIR-containing ubiquitin conjugating enzyme* (BRUCE/ Apollon/ BIRC6) [109] und Livin (KIAP/ ML-IAP/ BIRC7) [110].

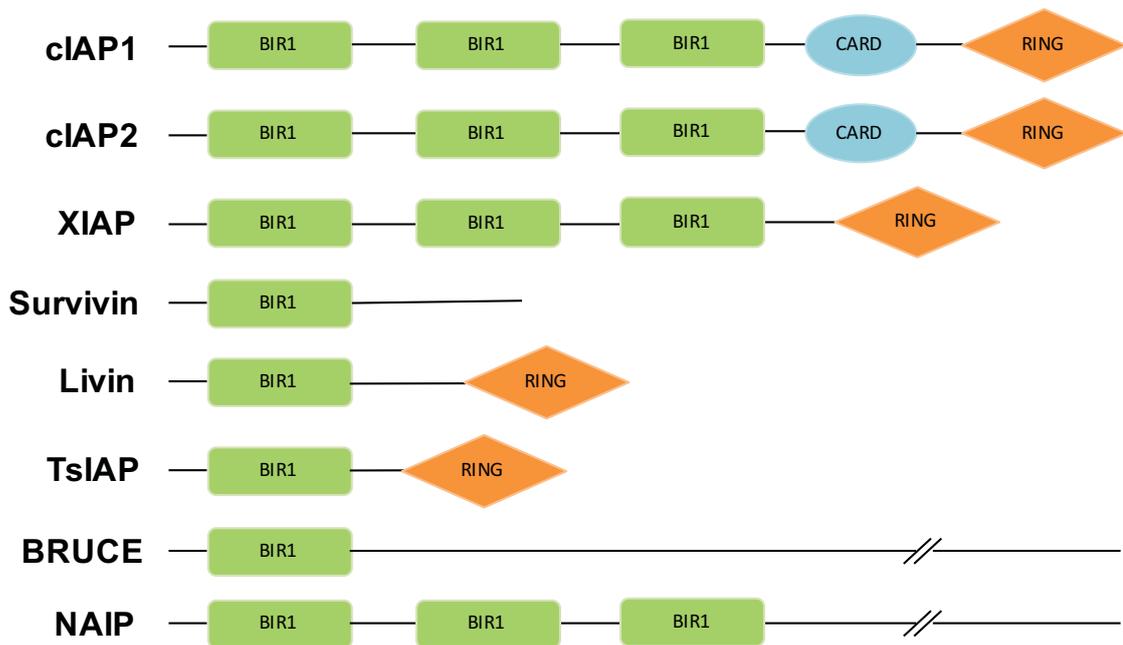


Abbildung 4: Struktur der *Inhibitor-of-Apoptosis Proteins*.

cIAP1: *cellular IAP-1*; cIAP2: *cellular IAP-2*; XIAP: *X-linked Inhibitor of Apoptosis*; TsIAP: *Testis-specific IAP*; BRUCE: *BIR-containing ubiquitin conjugating enzyme*; NAIP: *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*; BIR: *Boacloviral IAP repeat*; CARD: *Caspase activation and recruitment domain*; RING: *Really interesting new gene*.

XIAP, cIAP1 und cIAP2 sind strukturell und funktionell eng verwandt. Sie werden in einem Großteil aller humanen Gewebe exprimiert, zeigen jedoch in vielen Karzinomzelllinien eine erhöhte Expression [111, 112]. Sie verhindern die proteolytische Spaltung und somit die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7. Außerdem verhindern sie die Aktivierung der Pro-Caspase 9 durch Cytochrom c [101, 113, 114]. Die Wirkmechanismen der Caspasenhemmung sind dabei grundsätzlich unterschiedlich. XIAP bindet und inaktiviert die Caspasen 3 und 7 direkt. Demgegenüber können cIAP1 und -2 die Caspasen zwar direkt binden, die hemmende

1 Einleitung

Wirkung erfolgt aber indirekt über eine Degradierung durch ihre E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität [115-117]. Es gibt Hinweise, dass den BIR-Domänen unterschiedliche Rollen in der Regulation der Caspasen zukommen. Die Bindung der Caspase 3 durch XIAP scheint ausschließlich über die Linker Region zwischen BIR1 und BIR2 vermittelt zu sein, während zur Hemmung von Caspase 7 ebenfalls die BIR2 Domäne benötigt wird [118]. Die Bindung und Inaktivierung der Caspase 9 funktioniert über eine BIR3-vermittelte Bildung von Heterodimeren, welche die Bildung von Caspase 9 Homodimeren und damit die Aktivierung der Caspase 9 verhindert [119, 120].

Survivin ist ein strukturell einzigartiges IAP, es enthält nur eine einzige BIR-Domäne und besitzt statt einer RING-Zinkfingerdomäne nur eine α -Helix am carboxyterminalen Ende [106]. Es findet sich fast ausschließlich in entarteten Zellen, vor allem in höhergradigen Malignomen. Survivin wird streng Zellzyklus-abhängig in der G2/M-Phase exprimiert und eine Hemmung bewirkt starke mitochondriale Defekte bis zum Zelltod. Dies legt eine unverzichtbare Funktion im Rahmen der Zellteilung und Apoptose-Inhibition in Tumorzellen nahe [121, 122]. Die Verbindung zwischen Survivin und TRAIL-vermittelter Apoptose wird durch eine Vielzahl von Publikationen bestätigt, welche eine Korrelation zwischen starker Survivin-Expression und TRAIL-Resistenz zeigen [123-126]. Auch für cIAP1 und XIAP ist eine Korrelation hoher Expression mit schlechter Prognose sowie Chemotherapie-Resistenz nachgewiesen [112, 127-130].

Ihrerseits inhibiert werden die Mitglieder der IAP-Familie zum Beispiel durch direkte Bindung durch Smac/DIABLO (*Second mitochondrial activator of caspases/ Direct IAP Binding protein with Low PI*), einem 25 kDa großen Protein, welches die IAP-vermittelte Caspasen-Inaktivierung verhindern kann. Bei Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch verschiedene Reize wird Smac in den Mitochondrien proteolytisch gespalten und zusammen mit Cytochrom c freigesetzt [131]. Smac bildet daraufhin Homodimere, um an die IAPs zu binden (Abbildung 3). Während XIAP durch direkte Bindung durch Smac inhibiert wird, scheint ein Schlüsselmechanismus in der Regulation der cIAPs die Förderung ihrer E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität zur Auto-Ubiquitinierung und Proteindegradation zu sein [117, 132, 133].

Als weitere Resistenz-fördernde Strukturen sind das *cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme- Inhibitory Protein* (cFLIP) sowie die Mitglieder der Bcl-2 Familie

1 Einleitung

zu erwähnen. cFLIP enthält zwei DED am N-Terminus. Es kann damit an das Adaptermolekül FADD binden und darüber nicht funktionsfähige Heterodimere mit Caspase 8 bilden. So verhindert es die Ausbildung von Caspase 8 Homodimeren am DISC und dadurch deren Aktivierung mit konsekutiver Weiterleitung des Apoptosesignals. Damit hemmt cFLIP direkt die TRAIL-induzierte Apoptose [134, 135]. Außerdem werden ihm Funktionen in Zellzyklus-Regulierung und NF- κ B-Aktivierung zugeschrieben [136]. Die Proteine der Bcl-2 Familie wirken antiapoptotisch über eine negative Regulierung der mitochondrialen Membranpermeabilisierung und entsprechender Hemmung der Cytochrom c Freisetzung und der intrinsischen Apoptose [137, 138].

1.7 Therapeutische Regulation der IAPs durch Smac-Mimetika

Die Regulation der Apoptose ist das zentrale Thema der Krebsforschung. Die Überexprimierung von IAPs in einer Reihe von Malignomen unterstreicht ihre herausragende Stellung in diesem Forschungsgebiet. Durch ihre negativ regulatorischen Eigenschaften auf die TRAIL-vermittelte Apoptose bieten sie ein attraktives therapeutisches Ziel zur Steigerung der Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber dem apoptotischen Zelltod. Sie könnten somit zur Entwicklung neuer TRAIL-basierter Behandlungsmöglichkeiten bzw. zur Dosisreduktion und somit Prävention schädlicher Nebeneffekte als *Add-on* in Kombination mit anderen Chemotherapeutika therapeutisch genutzt werden. Aktuell stehen verschiedene Substanzen zur Inhibierung der IAPs zur Verfügung. Die bedeutsamste Gruppe sind die sogenannten Smac-Mimetika. Hierbei handelt es sich um chemische *Compounds*, welche die endogene Smac-Wirkung imitieren. Vertreter sind zum Beispiel GDC-0152 und Birinapant. Als Einzelsubstanzen scheinen diese Präparate auf eine auto- oder parakrine Sekretion von Todesrezeptor-Liganden angewiesen zu sein, um Apoptose zu induzieren, wie Petersen *et al.* am Beispiel von Bronchialkarzinom-Zelllinien zeigte [139]. Verschiedene präklinische Studien geben Hinweise auf eine bedeutsame sensitivierende Wirkung von Smac-Mimetika für TRAIL-vermittelte Apoptose in zuvor resistenten Zellen [140-142]. Daraus resultierend stellen Smac-Mimetika vor allem in der Kombination mit TRAIL einen sehr vielversprechenden neuen Ansatz in der Therapie fortgeschrittener Malignome wie dem metastasierten Radiojod-refraktären follikulären Schilddrüsenkarzinom dar.

1.8 Das TRAIL-System als therapeutisches Ziel in humanen Karzinomen

Die Erkenntnisse über die selektive Induktion von Apoptose in Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* rückten den TRAIL-Signalweg nach seiner Entdeckung in den Fokus vieler präklinischer Studien [143]. Tatsächlich konnte nach Behandlung mit rekombinantem TRAIL im Tiermodell ein apoptotisches Tumorzell-Sterben sowie unterdrücktes Tumorstadium und verbessertes Überleben bei guter Verträglichkeit in verschiedenen Tumoren beobachtet werden [143-150]. Seitdem wurden verschiedene TRAIL-Rezeptor-Agonisten (TRA) entwickelt und in ersten klinischen Studien getestet. Dabei stehen aktuell zwei Gruppen von TRA zur Verfügung. Rekombinante TRAIL-Formen und agonistische Antikörper für DR4/TRAIL-R1 oder DR5/TRAIL-R2. Rekombinantes TRAIL hat die Eigenschaft, beide Todesrezeptoren gleichzeitig anzusteuern, was eventuell ein stärkeres Apoptose-Signal auslöst als die spezifische Bindung an nur einen Rezeptor. Gleichzeitig kann es jedoch auch von den „Fänger“-Rezeptoren gebunden werden, was wiederum eine Abschwächung des Signals bedeuten könnte. Zu beachten ist auch die unterschiedliche Bedeutung der Todesrezeptor-Typen in verschiedenen Tumoren. In einigen Zelllinien ist überwiegend DR4/TRAIL-R1 für die Apoptose-Induktion verantwortlich, während in anderen Zelllinien der programmierte Zelltod über DR5/TRAIL-R2 ausgelöst wird [151-153]. Anfänglichem Enthusiasmus über die Entdeckung von TRAIL folgte die Feststellung, dass viele Tumorzellen primär nicht sensibel für die Behandlung mit TRAIL sind. Diese Resistenzen können in dem Expressionsmuster verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine begründet sein. Ein Ansatz zur Überwindung dieser Resistenzen ist die Kombination von TRAIL mit konventionellen Chemotherapeutika. Die einzige humane rekombinante Form von Apo2L/TRAIL (rhApo2L/TRAIL), welche klinisch erprobt wird ist Dulanermin. In Phase 1 Studien zeigte Dulanermin eine gute Verträglichkeit und keine relevanten Nebenwirkungen sowie Hinweise auf eine gute antitumorale Wirkung bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen, wie z.B. nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen (NSCLC; *non-small-cell-lung-cancer*), kolorektalen Karzinomen (CRC; *colorectal carcinoma*) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) [154-157]. Randomisiert kontrollierte klinische Studien wurden bisher lediglich zum Vergleich der Wirksamkeit von Chemotherapie + Dulanermin zu Chemotherapie alleine beim NSCLC sowie von Rituximab + Dulanermin zu Rituximab alleine beim NHL durchgeführt [158, 159]. Trotz der vielversprechenden präklinischen Ergebnisse konnte bisher keine dieser

1 Einleitung

Studien signifikant verbesserte Ergebnisse der Kombinationstherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie zeigen.

Mapatumumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen DR4/TRAIL-R1. Gegen DR5/TRAIL-R2 gerichtete monoklonale Antikörper sind Conatumumab, Lexatumumab, Tigatuzumab, Drozitumab sowie LBY-135. Randomisiert kontrollierte Studien gibt es bisher zu Mapatumumab zur Behandlung des CRC [160] und NSCLC [161], für Conatumumab bei Weichteilsarkomen [162], Pankreaskarzinomen [163], NSCLC [164] und CRC [165, 166] sowie für Tigatuzumab bei NSCLC [167], Pankreaskarzinom [168], Mammakarzinom [169] und hepatozellulärem Karzinom (HCC) [170]. In diesen Studien wurde die alleinige Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika bzw. dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib verglichen mit deren Kombination mit dem TRAIL-Rezeptor-Antikörper. Auch hier konnte trotz positiver Trends bisher kein signifikanter positiver Effekt beobachtet werden.

1.9 Ziele der Arbeit

Das metastasierte Radiojod-refraktäre differenzierte Schilddrüsenkarzinom ist aufgrund eingeschränkter therapeutischer Optionen mit einer sehr ungünstigen Prognose verbunden. Bisher gibt es kaum alternative medikamentöse Therapieansätze, wenn die etablierten Methoden der Chirurgie und adjuvanten Radiojodtherapie ausgeschöpft sind. TRAIL erlangte aufgrund seiner Eigenschaft als selektiver Apoptose-Induktor in Tumorzellen in den letzten Jahrzehnten beachtliche Aufmerksamkeit. Durchschlagende Erfolge scheiterten bisher an der Resistenzentwicklung zahlreicher Tumorzellen gegenüber dem TRAIL-Signal. Die Identifizierung der für diese Resistenzen verantwortlichen Strukturen und deren gezielte Ausschaltung könnte langfristig das Spektrum der Therapieoptionen unter anderem für das fortgeschrittene differenzierte Schilddrüsenkarzinom erweitern. Zur Evaluierung des TRAIL-Systems als mögliches therapeutisches Ziel in follikulären Schilddrüsenkarzinomen wurden daher folgende Ziele für diese Arbeit definiert:

1. Die Untersuchung der Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren im FTC und die Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten sowie dem Überleben
2. Die Bestimmung der Sensitivität der FTC Zelllinie gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose
3. Sequenzierung der Todesrezeptoren in der FTC Zelllinie zur Identifizierung möglicher TRAIL-Resistenz fördernder Mutationen
4. Evaluation der IAPs als potenzielle Zielstrukturen zur Überwindung einer bestehenden TRAIL-Resistenz

Hierzu wurden TRAIL und seine Rezeptoren in Gewebeproben von Patienten mit FTC sowie dem jeweils korrespondierendem nicht-neoplastischen Schilddrüsengewebe immunhistochemisch untersucht. Der immunreaktive-Score wurde anschließend mit klinischen Parametern, Gesamt- und rezidivfreiem-Überleben korreliert. In MTS-Assays und FACS-Analysen wurden Viabilität und Apoptoseraten nach Behandlung mit rekombinantem TRAIL quantifiziert. Durch Kombination von TRAIL mit Smac-Mimetika wurde ein sensitivierender Effekt für die TRAIL-induzierte Apoptose in FTC Zellen untersucht. Der Effekt von IAP-Inhibitoren sowie ihrer Kombination mit TRAIL wurde mittels Western Blot, MTS-Assay und FACS-Analyse bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
2023 MinicoldLab	LKB Bromma
Analog Vortex Mixer	VWR
BD FACSCanto	BD Biosciences
Bio Photometer	Eppendorf
Blotting Kammer + Zubehör	
C1000 Thermal Cycler	Bio Rad
Chromo 4 Thermal Cycler	Bio Rad
Comfort	Liebherr
Criterion Blotter	Bio Rad
Cryotherm	Biosafe MD
Elektrophoresekammer	
Forma -86°C ULT Freezer	Thermo Electron Corporation
Forma 405	Thermo Electron Corporation
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR
GENEMate	Star Lab
Heizplatte/Schüttler RCT Basic IKAMAG	IKA
Hera Cell Inkubator	Heraeus
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific
Infinite M200	Tecan
KS 250 Schüttler	Sigma Aldrich
Mikrowelle	
Mini-PROTEAN TetraCell	Bio Rad
neoBlock II	neoLab
Neubauer Zählkammer	Brand
Power Pac 300	Bio Rad
Premium no frost -20	Liebherr
Quick-Pak Microcentrifuge	Labnet
RM 5 Rollenmischer	Assistent
Sparkfree Laboratory Freezer	Thermo Electron Corporation

2 Material und Methoden

Sterilbank Herasafe KS	Heraeus
SU1400 Rollenmischer	Sunlab
Thermostatic Waterbath-WBS	Fried Electric
Universal 30 RF Zentrifuge	Hettich
Versa Doc MP 4000	Bio Rad
Wasserbad WNB 14	memmert
Wilovert A Mikroskop	Hund WETZLAR

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml und 50 ml Tubes	Falcon, corning science
25 cm³ und 75 cm³ Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one
6- und 96-well Platten	Corning inc.
Eppendorf Tubes	Eppendorf
FACS Röhrchen	BD Falcon
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBT Brand
MinElute Spin Columns	Qiagen
Objektträger und Deckgläser	Engelbrecht
Pasteur Pipetten	Brand
Pipettenspitzen 1 – 1000 µl	Star Lab
Stripetten 2 - 25 ml	Corning inc.

2 Material und Methoden

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acryamide 30 %	Bio Rad
Agarose	Sigma Life Science
Ammoniumpersulfat	Sigma
Antibody diluent	Zytomed Systems
Birinapant	Selleckchem
Bovine Serum Albumin Fraction (BSA)	Sigma
Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagenz	Promega
Clarity Western ECL substrate, luminol/enhancer solution	Bio Rad
Clarity Western ECL substrate, Peroxide solution	Bio Rad
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor	Roche
Corbit-Balsam	I.Hecht
Dimethyl Sulphoxide (DMSO) HYBRI-MAX	Sigma Life Science
Distilled Water DNase/ RNase free	Gibco
DMSO	Gibco
DPBS (1x)	Gibco
Dream Taq Green Master Mix	Thermo Scientific
Ethanol absolute	VWR Chemicals
FCS	
Filterpapier	
GDC-0152	Selleckchem
Gelred	Biotinum, VWR
Glycin	Merck
<i>Killer</i> TRAIL Storage and Dilution Buffer	Enzo Life Sciences
<i>Killer</i> TRAIL ALX-201-115	Enzo Life Sciences
Laemmli Puffer 6x	Bio Rad
Loading Dye solution 6x	Fermentas
Mayer's hemalum solution	Merck
Milchpulver	Nestlé
Nitrocellulose Membran	Thermo Scientific
Oligo (dT) Primer	invitrogen
PCR Nucleotide Mix	Roche
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH

2 Material und Methoden

Ponceau S	Sigma
Precision Plus Protein Western C Standard	Bio Rad
Precision Protein Streptactin HRP Konjugat	Bio Rad
Protector RNase Inhibitor	Roche
Protein Assay Dye reagent concentrate	Bio Rad
Puromycin	Invivogen
qPCR human reference total RNA	Agilent
RIPA-Puffer	Sigma Life Science
RPMI 1640 GlutaMAX	Gibco
SDS	Sigma Aldrich
TEMED	Sigma Aldrich
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche
Transcriptor RT Reaction Buffer	Roche
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma
Tris-Borate-EDTA buffer	Sigma
Trypanblau 0,4 %	Gibco
Trypsin-EDTA (1x) 0,25 %	Gibco
Tween 20	Sigma Life Science
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck
Xylol	VWR Chemicals

2.1.4 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
DAB Substrat Kit High Contrast	Zytomed Systems
FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit	Invitrogen
MinElute PCR Purification Kits	Qiagen
Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG Kit	Invitrogen
QIAamp[®] DNA Midi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
ZytoChem-Plus HRP Kit	Zytomed Systems

2 Material und Methoden

2.1.5 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Retrieval Solution	10 mM Na-Citrat-Puffer 3 mg Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 ml Aqua dest.
10x SDS Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin 10 g SDS ad 1000 ml Aqua dest.
10x Tansferpuffer	192 M Glycin 25 mM Tris ad 1800 ml Aqua dest.
10x TBS Waschpuffer	1,5 M NaCl 100 mM Tris ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,5
1,5 M Tris pH 8,8	181,65 g Tris ad 1000 ml Aqua dest.
1 M Tris pH 6,8	60,55 g Tris ad 500 ml Aqua dest.

2 Material und Methoden

2.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 2: Primersequenzen für die Real Time PCR

Primerbezeichnung	Richtung	Sequenz (5' > 3')
DCR 1	left	CCCTAAAGTTCGTCGTCGTC
	right	TGGTGGCAGAGTAAGCTAGGA
DCR 2 alpha	left	GCCTCAAGGAGGAGGAGTG
	right	TCTGTGCACGGGTTACAGG
DCR 2 beta	left	ATAAAAGTTCCTGTACCACGACC
	right	TTGCACTTGATGTCCTCCG
DR 4	left	GGGTCCACAAGACCTTCAAGT
	right	TGCAGCTGAGCTAGGTACGA
Trick 2a	left	CACAAAGAATCAGGCATCATCAT
	right	TGTGAGCTTCTGTCCACACG
Trick 2b	left	AAAGCACAGTGGGGAAGCC
	right	CGTTGTGAGCTTCTGTCCAC
TRAIL alpha	forward	GTCAGCTCGTTAGAAAGATGAT
	revers	GTCCAGGAATGAATGCCCAC
TRAIL beta	forward	ATGGCTATGATGGAGGTCCA
	revers	GCTTTTCTTTCTAACGAGCTGA
TRAIL gamma	forward	ATGGCTATGATGGAGGTCCA
	revers	GCTTTTCTGCTTCAGCTCGT
GAPDH	forward	ACGGATTTGGTCGTATTGGGCG
	revers	CTCCTGGAAGATGGTGATGG

2 Material und Methoden

Tabelle 3: Primersequenzen für die DNA-Sequenzierung

Primerbezeichnung	Richtung	Sequenz (5' > 3')
DR 5 Exon 1	Forward	GCAATCTCTGCGCCCACAAAA
	Revers	TCTCTCCCTGCCCTCTCCA
DR 5 Exon 2	Forward	CACTAAAGGATGTTTGAGAGG
	Revers	ACAGACTGGAAGCTCATGGA
DR 5 Exon 3	Forward	ACTGCCAGCTTCTGGGAA
	Revers	TCACCCCGCATTCCACCTTT
DR 5 Exon 4	Forward	CTGAGTTGAGCTGAGTAGCA
	Revers	CTGGGTCTTTTGGGGTTCCAT
DR 5 Exon 5	Forward	AGCACAGGGACCCACTGCTGA
	Revers	AGCACCTACCTGAGCAGATG
DR 5 Exon 10	Forward	TGGCTTTCTCCACCAGCTCTGAG
	Revers	GGAGTCCAGTTGGGCTTTTTCCA
DR 4 Exon 1	Forward	CACGCTGCTTCTTGGATTGA
	Revers	GCGCTTTTCCCCAGGCAG
DR 4 Exon 2	Forward	GGTGAGATCTGGAAGCCACT
	Revers	AGGGTAAGGAAAAGAGAGGTGT
DR 4 Exon 3	Forward	ATCCTCTGGGAACTCTGTGG
	Revers	TACCACTCCCACCTCACTGC
DR 4 Exon 4	Forward	AAGGTCAAGGGACACGTCAGG
	Revers	GCTTCTGTGGTTTCTTTGAGG
DR 4 Exon 5	Forward	AGACAGGAGTCTCGGGCTGCT
	Revers	ATCCACCTGGCCAGCTTTCCA
DR 4 Exon 10	Forward	TCTGCCCCTTCTGAACTGAG
	Revers	CATGAGCCACTACACCTGG

2 Material und Methoden

2.1.7 Antikörper

Tabelle 4: Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Acetyl-α-Tubulin XP Rabbit mAb	Cell signaling
Anti- TRAIL-R2 (human), clone TR2.21	Adipogen
Anti-DcR2 antibody	Abcam
Anti-TRAIL-R1 (human), clone TR1.02	Adipogen
Anti-TRAIL-R3 (human), clone TR3.06	Adipogen
cIAP1 antibody	Novus Biologicals
cIAP2 antibody	Novus Biologicals
Mouse monoclonal to GAPDH	abcam
PARP antibody	Cell Signaling
Survivin antibody	Novus Biologicals
TRAIL antibody	Novus Biologicals
XIAP Antikörper, Clone 28	BD Biosciences

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	Cell Signaling
Anti-mouse IgG peroxidase Conjugat	Sigma

Tabelle 6: Antikörper zur Isotyp-Kontrolle

Bezeichnung	Hersteller
APC Mouse IgG1 κ Isotype MOPC21	Biolegend
Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction	Dako

2.1.8 Software

Zur Datenerhebung wurden die Programme Quantity One Basic Version 4.6, BD FACSDiva Version 8.01 sowie iconcontrol Version 1.9 verwendet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism Version 5.0a (GraphPad, San Diego, CA, USA) und Statistical Software R Version 3.1.0 (R Development Core Team, 2014).

2 Material und Methoden

2.1.9 Zelllinie

Als Zelllinie zur Untersuchung des TRAIL-Signalweges im follikulären Schilddrüsenkarzinom wurde die TT2609-C02 Zelllinie vom DSMZ bezogen (ACC-510) [171]. Sie entstammt dem follikulären Schilddrüsenkarzinom eines 57-jährigen männlichen Kaukasiers mit Fernmetastasierung und im Verlauf entstandener Radiojod-Resistenz. Es handelt sich um eine als Monolayer wachsende, adhärente Linie, welche sich aus irregulär wachsenden, kleinen Zellen zusammensetzt. Histopathologisch handelte es sich bei dem Präparat um ein vornehmlich gut differenziertes follikuläres Schilddrüsenkarzinom, mit einzelnen verstreuten Arealen schlechter Differenzierung. Die Identität der Zelllinie wurde mittels Short-Tandem-Repeats (STR)-Analyse verifiziert.

2.1.10 Gewebeproben

Für die Herstellung der *Tissue Micro Arrays* (TMA) für immunhistochemische Färbungen wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 44 Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bereitgestellt. Alle Patienten mit histologisch gesichertem FTC, welche sich zwischen 1992 und 2014 in der Klinik für Allgemein-Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinik Düsseldorf einer kurativen Operation unterzogen wurden retrospektiv geprüft. Unsere Ausschlusskriterien beinhalteten ungenügende pathologische Befunde, fehlende klinische Daten, inkomplette Resektion der Tumorprobe und ungenügendes Tumormaterial für die anschließende Analyse. Daten bezüglich Gesamtüberleben sowie klinische Parameter wie Alter bei Erstdiagnose, Geschlecht, Zeitpunkt und Art der Operation, betroffener Schilddrüsenlappen und TNM-Stadium wurden aus unserer prospektiv angelegten klinischen Datenbank bezogen. Das Tumorstadium aller untersuchten Tumorproben wurde gemäß der siebten Ausgabe der UICC Klassifikation maligner Tumore bestimmt. Für die Entnahme dieser Gewebeproben zu Forschungszwecken lag eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf vor (Aktenzeichen 3821).

2 Material und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer *Laminar-Flow*-Werkbank der Firma Heraeus durchgeführt. Als Basis-Kulturmedium für alle Zellreihen diente RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco, ThermoFisher Scientific). Das Medium wurde mit 10 % Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P+S, Invitrogen) versetzt. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm² Zellkultur-Flaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Medium wurde vor Verwendung jeweils für etwa 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Bei Erreichen einer Zelldichte von circa 80 % Konfluenz wurden die Zellen zur Passagierung mit 1 x phosphatgepuffertes Saline (PBS, Gibco, ThermoFisher Scientific) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA gelöst. Nach Inkubation für 2-3 Minuten bei 37 °C wurden die gelösten Zellen in RPMI/FCS/P+S aufgenommen und im Verhältnis 1/6 auf neue Zellkultur-Flaschen verteilt.

2.2.2 Lebendzellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe der Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung mit 0,4 % Trypanblau (Gibco, ThermoFisher Scientific). Die zuvor gelösten Zellen wurden in Medium verdünnt, anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und in die Zählkammer gefüllt. Jedes Eckquadrat der Zählkammer besitzt mit einer Fläche von 1 mm² und einer Höhe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. Die Zelldichtebestimmung erfolgte durch Auszählung der vier Eckquadrate und Berechnung der Zellzahl/ml nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = [\text{Zellzahl} / \text{Zahl der Quadrate}] \times 2 \times 10^4$$

2.2.3 Behandlung der Zellen

Zur Behandlung der Zellen mit den verschiedenen *Compounds* wurde eine definierte Zellzahl ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die chemischen *Compounds* wurden im Anschluss in entsprechendem Zellkulturmedium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt und nach Abnahme des alten Mediums auf die Zellen gegeben. Die jeweilige Inkubationszeit für die entsprechenden Versuche wurde empirisch im Sinne einer Zeitleiste ermittelt, sodass die abschließende Inkubationszeit

2 Material und Methoden

als der Zeitpunkt gewählt wurde an dem der maximale Effekt des entsprechenden *Compounds* eintraf.

MTS-Assay

Für den MTS-Assay wurden in 96-*well* Platten jeweils 4×10^3 Zellen/*well* ausgesät. Die Inkubationszeit der Zellen mit dem jeweiligen *Compound* betrug 72 h (Tabelle 7).

Tabelle 7: Konzentrationen der chemischen *Compounds* für den MTS-Assay

<i>Compound</i>	Konzentration	Lösungsmittel
rh-TRAIL	0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 ng/ml	Killer TRAIL Storage and Dilution Buffer
Birinapant	3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M	DMSO
GDC-0152	3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M	DMSO

Die Konzentrationen für die Kombinationsbehandlungen wurden anhand der Ergebnisse der Einzelbehandlungen ausgewählt. Um einen sensitivierenden Effekt beurteilen zu können, wurden TRAIL-Konzentrationen deutlich unterhalb der gemessenen IC₅₀ (= 27,7 ng/ml) verwendet. Diese wurden mit einer ebenfalls niedrigen Konzentration des jeweiligen anderen *Compounds* kombiniert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Konzentrationen der chemischen *Compounds* für die Kombinationsbehandlung im MTS-Assay

<i>Compound 1</i>		<i>Compound 2</i>	
<i>Compound</i>	Konzentration	<i>Compound</i>	Konzentration
rh-TRAIL	0,3, 1, 3, 10 ng/ml	GDC-0152	1 μ M
		Birinapant	1 μ M

2 Material und Methoden

Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden in 6-well Platten jeweils 3×10^5 Zellen/well ausgesät. Die Inkubationszeit mit den chemischen *Compounds* betrug 12 h (Tabelle 9).

Tabelle 9: Konzentrationen der chemischen *Compounds* für die Durchflusszytometrie

<i>Compound</i>	Konzentration	Lösungsmittel
rh-TRAIL	1, 3, 10 ng/ml	Killer TRAIL Storage and Dilution Buffer
Birinapant	1, 3, 10 μ M	DMSO
GDC-0152	1, 3, 10 μ M	DMSO

Für die Sensitivierungsversuche durch Kombinationsbehandlungen mittels Durchflusszytometrie wurden die gleichen Konzentrationen wie im MTS-Assay verwendet (Tabelle 8).

Proteinisolation

Für die Proteinisolation wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen jeweils $0,7 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die Inkubationszeit mit den chemischen *Compounds* betrug 24 h (Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentrationen der chemischen *Compounds* für die Proteinisolation

<i>Compound</i>	Konzentration	Lösungsmittel
Birinapant	1, 3, 10 μ M	DMSO
GDC	1, 3, 10 μ M	DMSO

2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay

Um die Auswirkungen verschiedener chemischer *Compounds* auf die Viabilität der Zellen zu messen, wurde der kolorimetrische CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay der Firma Promega verwendet.

Grundlage ist die Reduktion des MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] zum farbigen Formazan durch NADPH oder NADH (Abbildung 5). Da die Produktion von NADPH/NADH

2 Material und Methoden

ausschließlich in metabolisch aktiven und damit vitalen Zellen erfolgt, korreliert die Höhe des Farbumschlags mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen.

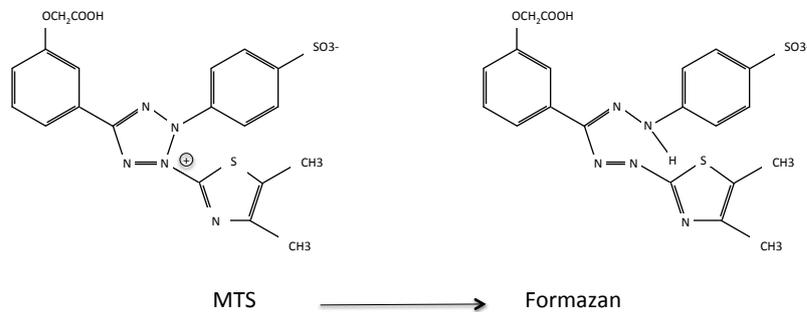


Abbildung 5: Reduktion des MTS-Reagenz

Hierzu wurden die zuvor mit 100 µl des Reaktionsansatzes behandelten Zellen nach Abschluss der Inkubationszeit mit weiteren 20 µl des Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagenz versetzt und für 30 Minuten bis 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag in den unbehandelten Kontrollen zu sehen war.

Die Absorption des Formazans wurde im Anschluss bei einer Wellenlänge von 490 nm mittels TECAN Infinite Reader 200 detektiert. Um unspezifische Hintergrundabsorption zu minimieren erfolgte eine anschließende Normalisierung gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm. Mithilfe des Programms tecan-i-control wurden die gemessenen Absorptionswerte im Anschluss nach Microsoft Excel exportiert und ausgewertet. Hierzu wurde die gemessene Viabilität nach Behandlung mit den jeweiligen chemischen Compounds mit der Absorption der jeweiligen Kontrollen ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Spezifisches Überleben} = (\text{Absorption nach Behandlung} / \text{Absorption der Kontrolle}) \times 100$$

Die jeweiligen Einzelwerte wurden aus dem Mittelwert dreier Replikate bestimmt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

Zur weiteren Untersuchung eines möglichen sensitivierenden Effektes der chemischen Compounds auf die TRAIL-induzierte Apoptose erfolgten im Anschluss

2 Material und Methoden

Kombinationsbehandlungen, welche mit der Formel nach Webb *et al.* [172] ausgewertet wurden. Dabei wird das Produkt aus spezifischem Überleben nach Behandlung mit einem chemischen Compound und dem spezifischen Überleben nach TRAIL-Behandlung errechnet, um das erwartete Überleben nach kombinierter Behandlung zu bestimmen. Liegt eine sensitivierende Wirkung des Compounds vor, so ist das tatsächlich gemessene spezifische Überleben nach Kombination geringer als das erwartete. Dies wird ausgedrückt durch das *Fractional Product* (FP), welches sich wie folgt berechnet:

$$FP = \text{Erwartetes Überleben} - \text{Gemessenes Überleben}$$

Werte größer 0,1 wurden als relevante Sensitivierung angesehen. Negative FP-Werte wurden nicht berücksichtigt.

2.2.5 Bestimmung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

FACS-Durchflusszytometer (FACS = *fluorescence activated cell sorting*) ermöglichen die Quantifizierung großer Zellzahlen sowie ihre Charakterisierung bezüglich verschiedener zellulärer Parameter. Das Prinzip beruht auf der einzelnen Führung der Zellen durch eine Kapillare im rechten Winkel vorbei an einem Laserstrahl und der Detektion des gestreuten Lichtsignals. Die Streuung des Lichts durch die Zelle wird in Richtung des Laserstrahls (FSC; *Forward Scatter*) und orthogonal dazu (SSC; *Side Scatter*) detektiert. Anschließend erfolgt in einem Signalwandler die Umwandlung in einen elektrischen Impuls, welcher mit der Intensität des Lichtsignals korreliert und digital gespeichert wird. Das Vorwärtsstreulicht ist dabei proportional zur Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Granularität der Zelle darstellt. Die zusätzliche Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen bietet die Möglichkeit der Erweiterung des Spektrums messbarer Eigenschaften. Das Fluoreszenzsignal wird nach Anregung durch den Laserstrahl, wie der SSC im 90°-Winkel detektiert (Abbildung 6). Durch den Einsatz von Farberteilerspiegeln und Bandpassfiltern gelingt die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome, sodass mit mehreren Fluorochromen zeitgleich gearbeitet werden kann [173].

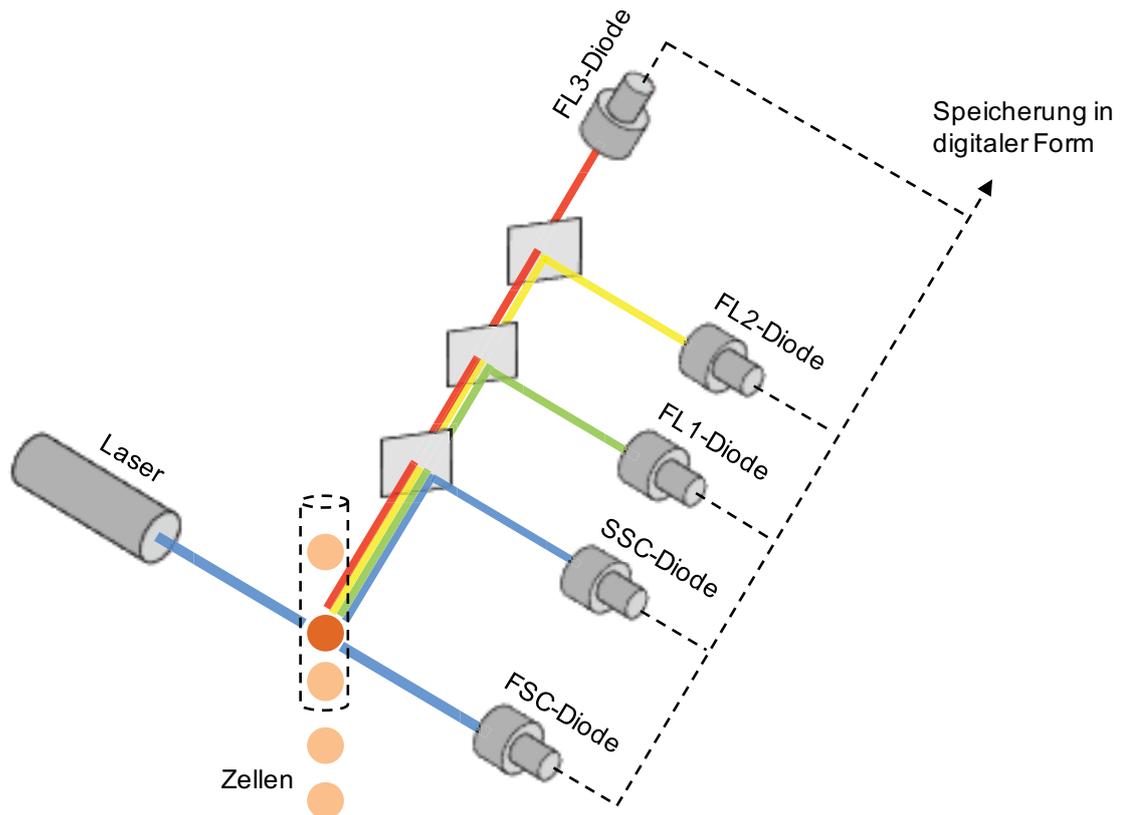


Abbildung 6: Prinzip der FACS-Analyse.

Die Zellen werden durch einen Laserstrahl angeregt. *Forward Scatter* (FSC)- und *Side Scatter* (SSC)-Dioden detektieren die entstehende Vorwärts- und Seitwärts-Streuung. Weitere Dioden, FL1, FL2 und FL3 (FL = Fluoreszierendes Licht) detektieren von Fluoreszenzfarbstoff-markierten und durch den Laser angeregten Zellen emittiertes Licht aufsteigender Wellenlänge.

Zur Identifizierung apoptotischer Zellen nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen wurde in dieser Arbeit das FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit von Invitrogen genutzt. Dabei werden zusätzlich zu FSC und SSC die Emissionen nach Färbung mit Fluoreszin-konjugiertem Annexin V (FITC Annexin V) und Propidiumiodid (PI) detektiert.

Grundlage dieser Analyse sind Veränderungen der Zellmembran im Rahmen der Apoptose. Phospholipide wie Phosphatidylserin (PS) befinden sich in lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran. Bereits in der frühen Phase der Apoptose translozieren diese Phospholipide auf die extrazelluläre Membranseite. FITC Annexin V bindet in Anwesenheit von Calcium mit einer hohen Affinität an auf der Membranaußenseite befindliches PS und ist in der Durchflusszytometrie als grüne Fluoreszenz mit einer Emissionswellenlänge um 530 nm detektierbar. PI, ein rot fluoreszierender, Nukleinsäure bindender Farbstoff (Emissionswellenlänge 575 nm) ist

2 Material und Methoden

nicht membrangängig in lebenden und früh-apoptotischen Zellen, jedoch in Zellen mit bereits aufgehobener Membranstruktur, also sowohl nekrotischen als auch im Spätstadium der Apoptose befindlichen Zellen. Damit kann er in diesen Zellen die Nukleinsäuren binden und rot färben. Nach Färbung mit FITC Annexin V sowie PI zeigen dementsprechend apoptotische Zellen eine grüne Fluoreszenz (FITC+/PI-). Nekrotische und spät-apoptotische Zellen fluoreszieren rot und grün (FITC+/PI+). Vitale Zellen werden kaum oder gar nicht angefärbt (FITC-/PI-) (Abbildung 7).

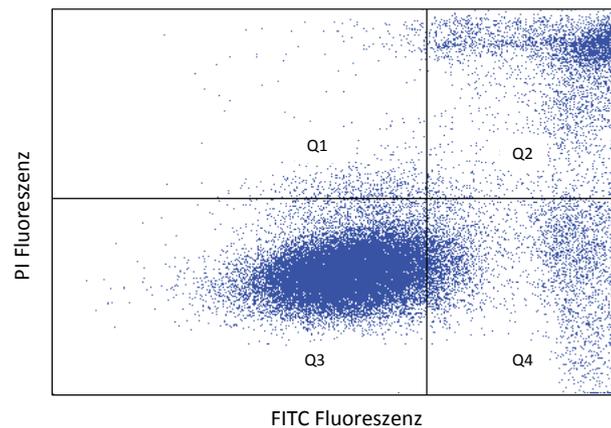


Abbildung 7: Beispielhaftes FACS-Analyse Ergebnis

Q1 = Zelldetritus: FITC-/PI+, Q2 = apoptotische Zellen: FITC+/PI+, Q3 = vitale Zellen: FITC-/PI-, Q4 = Früh-apoptotische Zellen: FITC+/PI-.

Nach Abschluss der Behandlung der Zellen wurden diese geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Annexin-bindendem Puffer auf eine Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 100 μ l pro Probe verdünnt. Zu jeder Probe wurden 5 μ l FITC Annexin V und 1 μ l PI-Arbeitslösung (100 μ g/ml) pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden erneut 400 μ l Annexin-bindender Puffer zugefügt. Danach folgte die Lagerung auf Eis und die sofortige Analyse mit dem BD FACSCanto (BD Bioscience).

2.2.6 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen. Dessen Funktionsprinzip beruht auf der Lyse der Zellen durch Guanidiniumthiocyanat sowie auf der Verwendung von Säulen mit Silica-Membranen, welche die freiwerdende RNA binden.

2 Material und Methoden

Hierbei wurden die Zellen mittels Trypsinisierung geerntet, mit PBS gewaschen und bei 800 rpm zentrifugiert. Je nach Größe des *pellets* erfolgte die Zugabe von 350-600 µl RLT-Puffer und nach Homogenisierung die Zugabe der gleiche Menge 70 % -igen Ethanols. Bis zu 700 µl des Gemischs wurden auf eine RNeasy Mini Säule geladen und anschließend 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert, die durchgetretene Flüssigkeit wurde danach verworfen. Es folgte die Zugabe von 350 µl RW 1 Puffer auf die Säule und die erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 x g. Es wurden dann 80 µl eines DNase Puffers (10 µl DNase I Stock Solution + 70 µl RDD Puffer) zugegeben, bevor ein zweites Mal mit 350 µl RW 1 Puffer gewaschen und 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert wurde. Es folgte zweimaliges Waschen mit 500 µl RPE Puffer mit 15 Sekunden und 2 Minuten Zentrifugation bei 8000 x g. Die Säule wurde dann in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute trocken zentrifugiert und anschließend in ein 1,5 ml Röhrchen gestellt. Zum Schluss wurden darauf 30 µl RNase freies Wasser geladen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Extrakt wurde auf Eis gekühlt und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.7 Reverse Transkription

Die Umschreibung der aus den Zellen isolierten RNA in ihre komplementäre DNA (cDNA) durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, ist Voraussetzung für die anschließende Polymerase Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) in Echtzeit (Real Time PCR) zur Quantifizierung der Expression verschiedener Gene auf RNA-Ebene.

Maximal 5 µg RNA wurden mit *Aqua dest.* auf ein Volumen von 11µl verdünnt und mit 2 µl Oligo-dT Primern [0,25 µg/µl] zur Denaturierung der RNA und Anlagerung der Primer für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Folgender Ansatz wurde im Anschluss jeder Probe zugefügt:

- 4 µl RT-Puffer
- 0,5 µl Protector RNase Inhibitor
- 2 µl dNTP-Mix
- 0,5 µl Reverse Transkriptase

Nach gründlicher Durchmischung folgte zunächst eine Inkubation für 30 Minuten bei 55 °C und anschließend zum Inaktivieren der RT eine Erhitzung für 5 Minuten auf

2 Material und Methoden

85°C. Im Anschluss erfolgte die weitere Lagerung auf Eis bzw. bei -20 °C. Als Kontrollen wurden jeweils ein Ansatz ohne RNA sowie ein Ansatz ohne RT mitgeführt.

2.2.8 Real Time PCR

Die Real Time PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren und zur quantitativen Messung der gewonnenen DNA. Nach Denaturierung zu Einzelstrang-DNA und Bindung spezifischer Primer synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase komplementäre Nukleinsäuresequenzen. Ein neu synthetisierter Strang dient dabei wieder als Matrize für eine neue Reaktion, was zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Amplifikate führt. In die DNA interkalierte Fluoreszenz-Farbstoffe (hier: SYBR-Green), welche durch eine Kamera detektiert werden, ermöglichen dabei die Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit.

Hier wurde das Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kit von Invitrogen verwendet. Der PCR-Ansatz für jede Probe setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl Primer-Mix [forward + reverse; jeweils 10 pmol/µl]

10 µl Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG

1 µl BSA (Bovines Serumalbumin)

6 µl *Aqua dest.*

Anschließend wurde jeweils 1 µl cDNA [250 ng/µl] hinzugefügt, sodass das Gesamt-Reaktionsvolumen 20 µl betrug. Die PCR-Reaktionen verliefen nach für jedes Amplifikat vorher festgelegten Bedingungen (Tabelle 11).

2 Material und Methoden

Tabelle 11: Real Time PCR Reaktionsbedingungen

Amplifikat	Annealing Temperatur (°C)	PCR-Programm
DR4/TRAIL-R1	55 °C	
TRICK2A	64 °C	95 °C → 5 min
TRICK2B	64°C	95 °C → 1 s
DcR1/TRAIL-R3	64 °C	Annealing Temp. → 20 s
DcR2/TRAIL-R4	61 °C	72 °C → 20 s
TRAIL-α	64 °C	Plate Read
TRAIL-β	64 °C	72 °C → 5 min
TRAIL-γ	64°C	Melting Curve 50 °C – 95 °C

} 39x

Die Quantifizierung erfolgte relativ nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [174]. Dabei wird die Expression des Zielgens auf die Expression eines konstant exprimierten Haushaltsgens bezogen. Die so ermittelte relative Expression des zu untersuchenden Gens in den Tumorproben wird dann auf eine Kontrollprobe bezogen. Grundlage dieser Berechnungen ist der in der Real Time PCR ermittelte C_T -Wert (*Cycle of Threshold*), die Zykluszahl, nach welcher das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Je niedriger dieser C_T -Wert, desto mehr Kopien des Amplifikats sind zu Beginn in der Probe enthalten. Um den relativen Expressionsunterschied des Zielgens zwischen der Tumorprobe und der Kontrollprobe, bezogen auf ein Kontrollgen zu ermitteln wird die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Haushaltsgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Tumorprobe} - \Delta C_T \text{ Kontrollprobe}$$

$$\text{relative Veränderungen der Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Als Haushaltsgen wurde GAPDH, als Kontrollprobe cDNA aus universeller humaner Referenz-RNA verwendet.

2 Material und Methoden

2.2.9 DNA-Isolierung

Die Isolierung von DNA aus Zellen der Zellkultur erfolgte mit Hilfe des QIAamp® DNA Midi Kits von Qiagen. Dabei werden Zellen lysiert und das Lysat auf spezielle Spinsäulen gegeben, in welchen nur die DNA an eine Silica-Membran bindet und in Waschschritten von Reststoffen befreit wird.

Dafür mussten die Zellen durch Trypsinierung geerntet und in 1-2 ml PBS aufgenommen werden. Dazu wurden zunächst 200 µl Protease und anschließend 40 µl RNase A gemischt. Nach Zugabe von 2,4 ml Puffer AL und Homogenisieren der Lösung folgte eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C im Wasserbad und anschließend die Zugabe von 2 ml 100 %-igem Ethanol mit erneuter Homogenisierung. Danach wurde in 2 Schritten jeweils die Hälfte der Lösung vorsichtig auf die QIAamp Midi Säule gegeben, ohne den oberen Rand zu benetzen und für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und es folgten 2 Waschschriffe, zunächst mit 2 ml Puffer AW 1 und 3-minütiger Zentrifugation, dann mit 2 ml Puffer AW 2 und 15-minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm. Das Eluat wurde erneut verworfen. Anschließend wurden 150 µl Puffer AE auf die Säule gegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 3 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder auf die Säule gegeben und erneut inkubiert und zentrifugiert. Das dadurch erhaltene DNA-Produkt wurde sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.10 DNA-Amplifizierung

Zur Mutationsanalyse der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 in den Zellen des follikulären Schilddrüsenkarzinoms wurden einzelne Genabschnitte der zuvor gewonnenen DNA mittels PCR und mithilfe spezifischer Primer (Tabelle 3) vervielfältigt.

Der PCR-Ansatz setzte sich für jede Probe folgendermaßen zusammen:

25 µl Dream Taq PCR Master Mix

2,5 µl Primer forward [10 µM]

2,5 µl Primer reverse [10 µM]

18 µl *Aqua dest.*

2 Material und Methoden

Dazu wurden jeweils 2 µl DNA gefügt, sodass das Gesamt-Reaktionsvolumen 50 µl betrug. Die PCR-Reaktion verlief nach nachfolgend aufgeführten Bedingungen:

95 °C → 2 min

95 °C → 30 s
58 °C → 30 s
72 °C → 30 s

} 35x

72 °C → 7 min

2.2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle einer erfolgreichen spezifischen Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte durch die eingesetzten Primer wurden je 5 µl PCR-Produkt, mit 1/5 Ladepuffer versetzt auf ein 2 %-iges Agarosegel (150 ml TBE-Puffer, 3 g Agarose, 15 µl GelRed-Fluoreszenzfarbstoff) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 45 Minuten bei 100 Volt.

2.2.12 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der mittels PCR amplifizierten Genabschnitte erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit und diente der Entfernung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen aus dem Reaktionsprodukt mit dem Ziel hoher DNA-Endkonzentrationen. Es wurde 1 Volumen PCR-Produkt mit 5 Volumen Puffer PB gemischt, auf eine MinElute Säule in einem 2 ml *Tube* gegeben und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats folgte ein weiterer Wasch-Schritt mit 750 µl Puffer PE, die zweimalige Zentrifugation für 1 Minute und die Überführung der Säule in ein sauberes 1,5 ml *Tube*. Zur Elution der DNA wurden 10 µl Puffer EB auf die Membran gegeben und nach 1 Minute Inkubation für 1 Minute zentrifugiert, um ca. 9 µl hoch konzentrierte DNA-Lösung zu erhalten.

2.2.13 Quantifizierung der Nukleinsäure-Konzentration und Sequenzierung

Die Quantifizierung der enthaltenen RNA- bzw. dsDNA-Konzentration erfolgte im Spektralphotometer TECAN Infinite Reader 200 durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktion (OD_{260}) wurde mit einem Umrechnungsfaktor multipliziert, welcher sich auf die Kenntnis der

2 Material und Methoden

Nukleinsäurekonzentration mit einem OD₂₆₀-Wert von 1 bezieht. Daraus ergibt sich die Berechnung anhand folgender Formeln:

$$\text{cRNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 40$$

$$\text{cDNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50$$

Die Sequenzierung, d.h. die Analyse der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül erfolgte durch die Kettenabbruchmethode (Didesoxymethode) nach Sanger [175] und wurde durch die Firma GATC Biotech durchgeführt.

2.2.14 Proteinisolierung und Proteinmengenbestimmung

Zur Isolierung des Gesamtproteins aus den Zellen wurden diese durch Trypsinierung geerntet und in PBS gewaschen. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 250 µl Protein-Lysepuffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert. Das Lysat wurde 15 Minuten auf Eis gelagert und währenddessen alle 5 Minuten durch Vortexen durchmischt. Es folgte die Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C. Der Überstand mit dem Proteinlysate wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet verworfen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in dem gewonnenen Lysat erfolgte mit Hilfe des Biophotometers der Firma Eppendorf nach der Methode von Bradford [176].

2.2.15 Vorbereitung der Proteinproben für den Western Blot und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

20 µg Protein wurden mit *Aqua dest.* auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Darin wurde Laemli-Ladepuffer im Verhältnis 1:6 verdünnt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C. Es folgte die kurze Lagerung auf Eis und anschließend die sofortige Weiterverarbeitung oder Aufbewahrung bei -20 °C

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte geelektrophoretisch in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel.

Dazu wurde zunächst ein Trenngel gegossen. Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten für ein Gesamtvolumen von 10 ml ist abhängig von der Prozentigkeit des zu gießenden Gels und richtet sich nach der Größe des zu detektierenden Proteins (Tabelle 12).

2 Material und Methoden

Tabelle 12: Zusammensetzung des Trenngels in Abhängigkeit von der Prozentigkeit

Chemikalie (ml)	8 %-Gel	10 %-Gel	15 %-Gel
<i>Aqua dest.</i>	4,6	4,0	2,3
30 % Acryamid-Mix	2,7	3,3	5,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5
10 % SDS	0,1	0,1	0,1
10 % Ammoniumpersulfat	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004

Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und auf das Trenngel aufgetragen. Die Zusammensetzung für ein Gesamtvolumen von 4 ml ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Sammelgels

Chemikalie (ml)	5 %-Gel
<i>Aqua dest.</i>	2,7
30 % Acryamid-Mix	0,67
1,5 M Tris (pH 6,8)	0,5
10 % SDS	0,04
10 % Ammoniumpersulfat	0,04
TEMED	0,004

Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer mit 1x SDS Laufpuffer. Die gesamte Proteinlösung wurde dazu in die Kammern des Gels aufgetragen, als Laufmarker dienten 5 µl Precision Plus Protein Western C Standards. Zur Elektrophorese wurde bei 4 °C für 30 Minuten eine Spannung von 90 Volt und anschließend für weitere 45 Minuten eine Spannung von 115 Volt angelegt.

2 Material und Methoden

2.2.16 Western Blot und Detektion

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels *wet blot*-Technik von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dabei wurden in einer *Blotting*-Kammer mit Transfer-Puffer Acrylamidgel, Nitrocellulose-Membran, Filterpapiere sowie Schwämme so in einem speziellen Schlitten angeordnet, dass eine elektrische Spannung senkrecht zum Gel angelegt werden kann, welche die Wanderung der Proteine in Richtung Anode und somit auf die Nitrocellulose-Membran bewirkt. Der genaue Aufbau der *Blotting*-Apparatur ist in der (Abbildung 8) dargestellt.

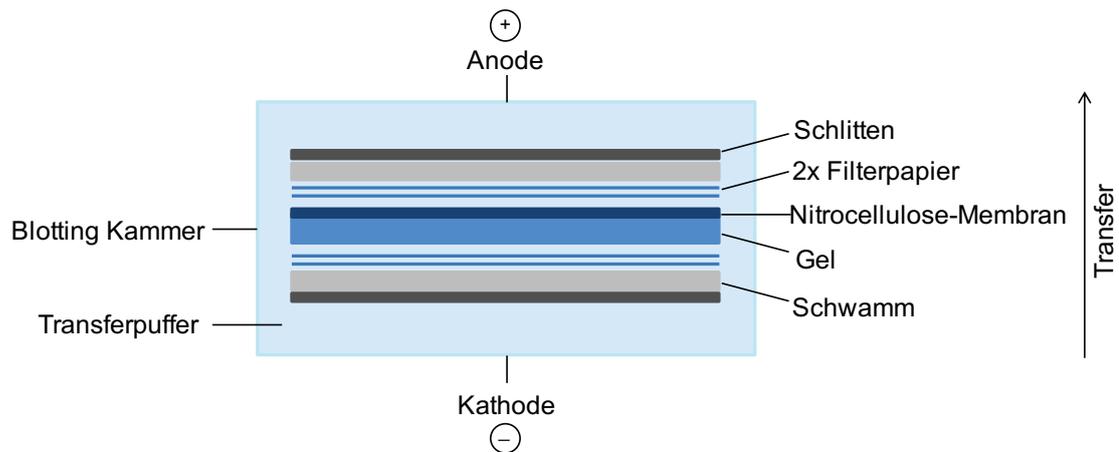


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer Blotting-Kammer

Der Transfer erfolgte bei 4 °C über 90 Minuten bei einer Spannung von 90 Volt. Anschließend wurde eine unspezifische Anfärbung der Protein-Banden mit Ponceau-S zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers durchgeführt. Nach ca. 1-minütiger Inkubation wurde der Farbstoff durch Abspülen mit *Aqua dest.* und Waschen mit 1x TBS mit 0,1 % Tween20 (TBS-T) entfernt. Die Membran wurde in ein 50 ml Falcon überführt und zum Blockieren unspezifischer Bindungen 60 Minuten mit zum Antikörper passender Blockierlösung bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde dann in 3 ml der jeweiligen Blockierlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt (Tabelle 14), auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Roller inkubiert. Nach 2 Waschgängen mit 1x TBS-T wurden 3 ml der passenden Sekundär-Antikörper-Lösung in der Verdünnung 1:1000 mit 1,3 µl Precision Protein Streptactin HRP Konjugat auf die Membran gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation auf dem Roller, sowie 2-maligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Auswertung mit dem VersaDoc MP 4000 von BioRad. Dazu wurde die Membran

2 Material und Methoden

mit 1 ml 1:1 *luminol/enhancer*-Lösung und *peroxide*-Lösung von BioRad versetzt. Im Anschluss daran erfolgte auf gleiche Weise die Detektion der Haushaltsgene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) oder α -Tubulin zur Ladungskontrolle. Primär- und Sekundär-Antikörper wurden dabei im Verhältnis 1:5000 in 5 %-iger Milchpulverlösung verdünnt.

Tabelle 14: Übersicht der Primär-Antikörper und ihrer Versuchsbedingungen für den Western Blot

Antigen	Molekulargewicht (kDa)	Verdünnung	Blockierlösung	Sekundär-Antikörper
cIAP 1	70	1:1000	5 % Milchpulver	Rabbit IgG HRP
cIAP 2	70	1:500	5 % Milchpulver	Rabbit IgG HRP
DR4/ TRAIL-R1	60	1:500	5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase
DR5/ TRAIL-R2	60	1:500	5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase
DcR1/ TRAIL-R3	48	1:500	5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase
DcR 2/ TRAIL-R4	42	1:500	5 % Milchpulver	Rabbit IgG HRP
TRAIL	32	1:250	5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase
Survivin	16,5	1:1000	5 % Milchpulver	Rabbit IgG HRP
XIAP	57	1:1000	2,5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase
PARP	89, 116	1:1000	5 % Milchpulver	Rabbit IgG HRP
α-Tubulin	50	1:5000	5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase
GAPDH	36	1:5000	5 % Milchpulver	Mouse IgG-Peroxidase

2.2.17 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung mikroskopischer Schnitte beruht auf der spezifischen und hochaffinen Bindung von Antikörpern an ihr Epitop. Die Möglichkeit, dass die freie Bindungsstelle dieser Antikörper als Bindungsstelle für einen weiteren

2 Material und Methoden

Farbstoff-gebundenen Zweitantikörper dienen kann, erlaubt die spezifische Anfärbung molekularer Strukturen in Gewebeproben und deren mikroskopische Auswertung. Es wurden keine Einzelpräparate gefärbt, sondern *Tissue micro arrays* (TMA). Diese Methode ermöglicht das Übertragen von zahlreichen Gewebezylindern aus histologisch definierten Regionen verschiedener Tumortypen in einen einzigen Paraffinblock. Die Anfertigung von Schnitten dieser Paraffinblöcke ermöglicht so die zeitgleiche Anfärbung und Beurteilung großer Zahlen von Gewebeproben.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der ABC-Methode mit Hilfe des ZytoChem-Plus HRP Kits von Zytomed Systems. Das Vorgehen beinhaltete zunächst die Entparaffinisierung der Gewebeschnitte in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Präparate 30 Minuten in Natrium-Citrat Puffer (pH 6,0) gekocht. Durch 10-minütige Inkubation mit 150 µl 3 % -iger Wasserstoffperoxid-Lösung wurde die endogene Peroxidase inhibiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Präparate anschließend für 10 Minuten mit der Blockierlösung inkubiert. Dann wurden 150 µl des Primärantikörpers in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 15) auf den Objektträger gegeben und 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran folgten die 15-minütige Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper und die Zugabe von 2 Tropfen Streptavidin-HRP-Konjugat mit 30-minütiger Inkubation. Dabei wurde zwischen allen Schritten mit 1x PBS + 0,1% Tween20 gewaschen. Zur Visualisierung wurden dann 3-4 Tropfen *high contrast* DAB-Substrat (3,3'-Diaminobenzidin) auf jedes Präparat aufgetragen und für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Kernfärbung in Mayers-Hämalaun sowie zur Dehydrierung eine aufsteigende Reihe in Ethanol und Xylol. Zum Schluss wurden die Schnitte luftblasenfrei mit Corbitlösung eingedeckelt.

2 Material und Methoden

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Antikörper und ihre Versuchsbedingungen für die Immunhistochemie

Epitop	Spezies	Verdünnung
TRAIL	Maus	1:50 (10 µg/ml)
DR4/TRAIL-R1	Maus	1:50 (20 µg/ml)
DR5/TRAIL-R2	Maus	1:50 (20 µg/ml)
DcR1/TRAIL-R3	Maus	1:25 (40 µg/ml)
DcR2/TRAIL-R4	Kaninchen	1:250 (0,9892 µg/ml)

Als Positivkontrolle wurden Gewebe von kolorektalem Karzinom und Tonsille gefärbt, als Isotypkontrolle diente APC Mouse IgG1 κ Isotype MOPC21 für Maus-IgG und Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction für Kaninchen-IgG. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch anhand einer modifizierten Form des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner [177] durch zwei unabhängige Untersucher (Tabelle 16).

Tabelle 16: Immunreaktiver Score (IRS) zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Farbintensität Prozent Positiver Färbung	Keine	Schwach	Mäßig	Stark
	(0+)	(1+)	(2+)	(3+)
≤ 5 % (0+)	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
6-25 % (1+)	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
26-50 % (2+)	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-75 % (3+)	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 75 % (4+)	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

2 Material und Methoden

2.2.18 Statistik

Mittelwertsunterschiede zwischen zwei Gruppen wurden bei fehlender Normalverteilung mithilfe des Mann-Whitney-U Tests für unabhängige Stichproben auf Signifikanz geprüft. Zum Vergleich mehrerer Messstufen unabhängiger Variablen wurde der Kruskal-Wallis Test als nicht-parametrisches Pendant zur einfaktoriellen ANOVA durchgeführt. Als post hoc Test diente der Dunn's multiple comparison Test. Korrelationen zwischen intervallskalierten Variablen wurden mithilfe der Spearman-Rangkorrelation getestet, bei nominalskalierten Variablen wurden Zusammenhänge mit dem Fisher's exact Test bestimmt. Für univariate Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt und mittels log-rank Test ausgewertet und das *Hazard Ratio* (HR) mit Konfidenzintervall (CI) als deskriptives Maß für den Unterschied von Überlebenszeiten ermittelt. Eine multivariate Überlebensanalyse mit allen verfügbaren Variablen erfolgte mittels Cox Regression in einem schrittweise rückwärts ausschließenden Modell. Das Gesamtüberleben wurde definiert als die Zeit zwischen der Operation und dem Tod jeglicher Ursache oder bis zum Zeitpunkt des letzten *follow-up*. Die Regressionsanalyse wurde zunächst mit allen Variablen durchgeführt und dann durch eine schrittweise Selektion fokussiert, basierend auf den *Akaike information criterion* (AIC). Zur internen Validierung diente eine Bootstrap Analyse mit 500 Wiederholungen.

Zusätzlich wurde als explorative Analyse ein Regressionsbaum erstellt, um Markerkonstellationen mit besonders hohem Sterberisiko zu identifizieren. Diese Technik kombiniert einen Algorithmus rekursiver Partitionierung und Permutationstests, um zu bestimmen ob eine signifikante Assoziation zwischen einer Kovariablen und der Responsevariablen angenommen werden kann. Das Ergebnis wird graphisch als Entscheidungsbaum dargestellt und liefert einen jeweiligen *Hazard Ratio* (HR) für die gegebene Markerkonstellation. So wird zu jedem Attribut ein Schwellwert gesucht, der eine optimale Trennung der Daten in Bezug auf die Zielgröße (das Überleben) zulässt. Die Attribute sind hierbei hierarchisch gegliedert. Je höher der Informationsgehalt eines Attributs in Bezug auf die Zielgröße, desto weiter oben im Entscheidungsbaum findet sich dieses. Jeder Aufteilung ist ein p-Wert zugeordnet, welcher durch einen Permutationstest ermittelt wurde.

Für die statistischen Analysen wurden die Software GraphPad Prism Version 5.0a (GraphPad, San Diego, CA, USA) sowie die Statistical Software R Version 3.1.0 (R

2 Material und Methoden

Development Core Team, 2014) verwendet. *P*-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Expression des TRAIL-Systems in follikulären Schilddrüsenkarzinomen

Zur Evaluation der Expression des TRAIL-Systems und ihrer Bedeutung für die Prognose des follikulären Schilddrüsenkarzinoms wurden *Tissue micro arrays* (TMA) mit Gewebeproben von 44 Patienten mittels HRP-Immunhistochemie gefärbt. Die TMAs enthielten Proben aus Tumor sowie jeweils korrespondierendem Normalgewebe und, soweit vorhanden, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidiven. Eine Übersicht der Patientencharakteristika liefert Tabelle 17.

Untersucht wurde die Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4.

Die Auswertung der Daten und ihre Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Gesamtüberleben erfolgte entsprechend den *REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies* (REMARK) [178].

3.1.1 Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in Tumor- und Normalgewebe

Zunächst wurde die Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in Tumor- und Normalgewebe miteinander verglichen. Es ergaben sich für alle untersuchten Proteine signifikante Unterschiede in der Expression zwischen Tumor und Normalgewebe (Abbildung 9)

Die IRS-Werte für TRAIL ($p < 0,001$), DR4/TRAIL-R1 ($p < 0,001$), DR5/TRAIL-R2 ($p < 0,001$), DcR1/TRAIL-R3 ($p < 0,001$) und DcR2/TRAIL-R4 ($p < 0,05$) waren in den Proben aus Tumorgewebe signifikant höher als in den Proben aus Normalgewebe. Bei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom zeigte also Tumorgewebe eine signifikant höhere Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren verglichen mit Normalgewebe.

3 Ergebnisse

Tabelle 17: Patientencharakteristika

Merkmal	Anzahl Patienten (%)
Total	44 (100)
Alter	
Median (von - bis)	59 (17-85)
Geschlecht	
Männlich	19 (43)
Weiblich	25 (57)
Art der Operation	
Hemithyreoidektomie	3 (7)
Mit unilateraler ND	1 (2)
Subtotale Thyreoidektomie	11 (25)
Mit unilateraler ND	4 (9)
Mit zentraler LA	1 (2)
Totale Thyreoidektomie	7 (16)
Mit zentraler LA	4 (9)
Mit unilateraler ND	2 (5)
Mit bilateraler ND	11 (25)
T-Stadium	
T1/2	24 (55)
T3/4	20 (45)
Lymphknotenstatus	
N0	41 (93)
N1 a/b	3 (7)
Fernmetastasierung	
M0	38 (86)
M1	6 (14)
UICC-Stadium	
UICC 1/2	22 (50)
UICC 3/4	22 (50)
Invasivität	
Minimal	21 (48)
Grob	20 (45)
Unbekannt	3 (7)
Rezidiv	
Nein	18 (41)
Ja	9 (20)
Unbekannt	17 (39)

ND = Neck Dissection, LA = Lymphadenektomie, UICC = Union internationale contre le cancer

3 Ergebnisse

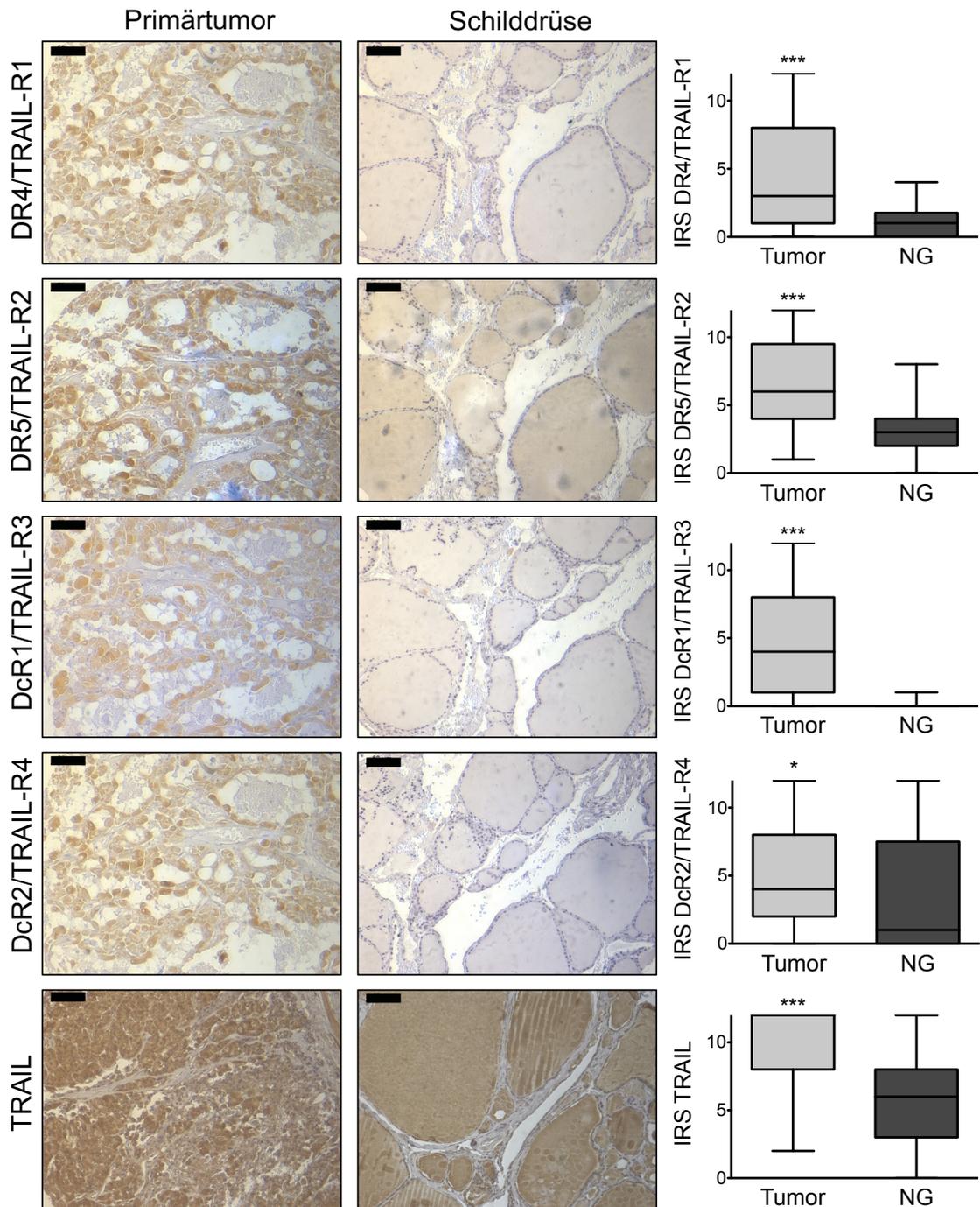


Abbildung 9: Vergleich der Expression in Tumor und Normalgewebe von Patienten mit FTC.

Repräsentative immunohistochemische Färbungen von DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3, DcR2/TRAIL-R4, TRAIL in Tumor- und Normalgeweben in 20-facher Vergrößerung (Balken in der oberen linken Ecke entspricht 50 μ m). Alle Beispielbilder zeigen starke Färbungen, entsprechend einem IRS = 12. Die Box-Plots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und -Minimum. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1.2 Assoziation der Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren mit klinischen Parametern

Um eine Assoziation zwischen der Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren sowie klinisch-pathologischen Daten zu untersuchen wurden zunächst die IRS zwischen einzelnen Gruppen für jedes klinische Merkmal verglichen. Die immunhistochemische Analyse ergab unterschiedliche Expressionsmuster in Zusammenhang mit mehreren klinisch-pathologischen Parametern (Abbildung 10). Die Merkmale Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung konnten aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht hinsichtlich ihrer Assoziation mit der Expression untersucht werden. Einzelne Proben gingen methodenbedingt, z.B. durch Abschwimmen während des Färbeprozesses verloren und konnten nicht ausgewertet werden, dadurch ergeben sich abweichende Stichprobengrößen. So fehlen jeweils Proben von drei Patienten für DcR1/TRAIL-R3 ($n = 41$), DcR2/TRAIL-R4 ($n = 41$) und DR5/TRAIL-R2 ($n = 41$) sowie eine Probe für DR4/TRAIL-R1 ($n = 43$) und zwei Proben für TRAIL ($n = 42$).

Patienten mit einem FTC in den Stadien T 3/4 ($p < 0,01$) sowie UICC III/IV ($p < 0,05$) zeigten eine signifikant höhere Expression von DcR1/TRAIL-R3 gegenüber den niedrigeren Tumorstadien. Vergleichbare Ergebnisse wurden für den Rezeptor DcR2/TRAIL-R4 beobachtet. Auch hier zeigten Patienten mit einem FTC in den Stadien T 3 und T 4 ($p < 0,05$) sowie UICC III und UICC IV ($p < 0,01$) eine signifikant höhere Expression gegenüber den Patienten mit niedrigeren Tumorstadien. Außerdem war die Expression von DcR2/TRAIL-R4 signifikant höher in grob-invasiven Karzinomen als in minimal-invasiven Karzinomen ($p < 0,05$). Für den Todesrezeptor DR5/TRAIL-R2 zeigte sich ebenfalls, dass Patienten mit höheren Tumorstadien T 3 und T 4 ($p < 0,05$) oder UICC III und UICC IV ($p < 0,05$) signifikant höhere Expressionen aufwiesen als Patienten mit niedrigerem Tumorstadium. Keine signifikanten Unterschiede konnten für die Expression von TRAIL sowie DR4/TRAIL-R1 im Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern beobachtet werden. Ebenso konnten in den Untergruppen der Merkmale Alter und Geschlecht keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden.

3 Ergebnisse

Auftreten von Rezidiven ($p < 0,01$). Außerdem konnte eine positive Korrelation mit grob-invasivem Wachstum ($p < 0,01$) beobachtet werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Korrelation zwischen DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen.

Statistische Auswertung mittels Fisher's exact Test.

Merkmal	DcR1/TRAIL-R3			DcR2/TRAIL-R4		
	Niedrig n = 18 (%)	Hoch n = 23 (%)	p-Wert	Niedrig n = 17 (%)	Hoch n = 24 (%)	p-Wert
Alter						
< Median	10 (56)	12 (52)	1,0	9 (53)	12 (50)	1,0
≥ Median	8 (44)	11 (48)		8 (47)	12 (50)	
Geschlecht						
Männlich	7 (39)	11 (48)	0,752	5 (29)	13 (54)	0,201
Weiblich	11 (61)	12 (52)		12 (71)	11 (46)	
T-Status						
T1/2	14 (78)	9 (39)	0,025 *	14 (82)	9 (38)	0,0096 **
T3/4	4 (22)	14 (61)		3 (18)	15 (62)	
LK-Metastase						
N0	17 (94)	21 (91)	1,0	17 (100)	21 (88)	0,254
N1a/b	1 (6)	2 (9)		0 (0)	3 (12)	
Fernmetastasen						
M0	16 (89)	19 (83)	0,679	15 (88)	20 (83)	1,0
M1	2 (11)	4 (17)		2 (12)	4 (17)	
UICC-Stadium						
UICC 1/2	13 (72)	8 (35)	0,028 *	14 (82)	7 (29)	0,0013 **
UICC 3/4	5 (28)	15 (65)		3 (18)	17 (71)	
	Niedrig n = 12 (%)	Hoch n = 13 (%)		Niedrig n = 10 (%)	Hoch n = 15 (%)	
Rezidiv						
Nein	11 (92)	6 (46)	0,030 *	10 (100)	7 (47)	0,0077 **
Ja	1 (8)	7 (54)		0 (0)	8 (53)	
	Niedrig n = 17 (%)	Hoch n = 22 (%)		Niedrig n = 17 (%)	Hoch n = 22 (%)	
Invasivität						
Minimal	12 (71)	9 (41)	0,106	13 (76)	7 (32)	0,0095 **
Grob	5 (29)	13 (59)		4 (24)	16 (68)	

LK = Lymphknoten, UICC = Union internationale contre le cancer, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Für den Rezeptor DR4/TRAIL-R1 ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit klinischen Parametern. Eine hohe Expression des Rezeptors DR5/TRAIL-R2 konnte dagegen signifikant positiv mit hohem T-Status ($p < 0,005$), hohem UICC-Stadium ($p < 0,005$) sowie grob-invasivem Wachstum ($p < 0,05$) assoziiert werden (Tabelle 19).

3 Ergebnisse

Tabelle 19: Korrelation zwischen DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen.

Statistische Auswertung mittels Fisher's exact Test.

Merkmal	DR4/TRAIL-R1			DR5/TRAIL-R2		
	Niedrig n = 20 (%)	Hoch n = 23 (%)	p-Wert	Niedrig n = 22 (%)	Hoch n = 19 (%)	p-Wert
Alter						
< Median	9 (45)	13 (57)	0,5467	11 (50)	9 (47)	1,0
≥ Median	11 (55)	10 (43)		11 (50)	10 (53)	
Geschlecht						
Männlich	9 (45)	10 (43)	1,0	9 (41)	9 (47)	0,758
Weiblich	11 (55)	13 (57)		13 (59)	10 (53)	
T-Status						
T1/2	11 (55)	12 (52)	1,0	17 (77)	4 (21)	0,0005 ***
T3/4	9 (45)	11 (48)		5 (23)	15 (79)	
LK-Metastase						
N0	18 (90)	22 (96)	0,590	22 (100)	16 (84)	0,091
N1a/b	2 (10)	1 (4)		0 (0)	3 (16)	
Fernmetastasen						
M0	17 (85)	20 (87)	1,0	19 (86)	16 (84)	1,0
M1	3 (15)	3 (13)		3 (14)	3 (16)	
UICC-Stadium						
UICC 1/2	10 (50)	11(48)	1,0	16 (73)	3 (16)	0,0004 ***
UICC 3/4	10 (50)	12 (52)		6 (27)	16 (84)	
	Niedrig n = 13 (%)	Hoch n = 13 (%)		Niedrig n = 14 (%)	Hoch n = 11 (%)	
Rezidiv						
Nein	10 (77)	8 (62)	0,673	11 (79)	6 (55)	0,389
Ja	3 (23)	5 (38)		3 (21)	5 (45)	
	Niedrig n = 19 (%)	Hoch n = 22 (%)		Niedrig n = 20 (%)	Hoch n = 19 (%)	
Invasivität						
Minimal	11 (58)	10 (45)	0,5359	14 (70)	6 (32)	0,0256 *
Grob	8 (42)	12 (55)		6 (30)	13 (68)	

LK = Lymphknoten, UICC = Union internationale contre le cancer, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$

Die Expressionsstärke des TRAIL-Liganden ergab keinen signifikanten Zusammenhang mit einem der geprüften klinisch-pathologischen Merkmale (Tabelle 20).

3 Ergebnisse

Tabelle 20: Korrelation zwischen TRAIL Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen.

Statistische Auswertung mittels Fisher's exact Test.

Merkmal	TRAIL		<i>p</i> -Wert
	Niedrig n = 16 (%)	Hoch n = 26 (%)	
Alter			
< Median	8 (50)	13 (50)	1,0
≥ Median	8 (50)	13 (50)	
Geschlecht			
Männlich	6 (38)	12 (46)	0,750
Weiblich	10 (62)	14 (54)	
T-Status			
T1/2	10 (62)	13 (50)	0,530
T3/4	6 (38)	13 (50)	
LK-Metastase			
N0	16 (100)	23 (88)	0,275
N1a/b	0 (0)	3 (12)	
Fernmetastasen			
M0	15 (94)	21 (81)	0,380
M1	1 (6)	5 (19)	
UICC-Stadium			
UICC 1/2	9 (56)	12 (46)	0,751
UICC 3/4	7 (44)	14 (54)	
	Niedrig n = 9 (%)	Hoch n = 16 (%)	
Rezidiv			
Nein	6 (67)	11 (69)	1,0
Ja	3 (33)	5 (31)	
	Niedrig n = 16 (%)	Hoch n = 25 (%)	
Invasivität			
Minimal	9 (56)	11 (44)	0,530
Grob	7 (44)	14 (56)	

LK = Lymphknoten, UICC = Union internationale contre le cancer

3 Ergebnisse

Analysiert man daraufhin die Korrelationen der Rezeptorexpressionen untereinander, fallen lineare Zusammenhänge der Expressionsstärken von DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 ($r = 0,5966$, $p < 0,0001$), von DcR1/TRAIL-R3 und DR4/TRAIL-R1 ($r = 0,3357$, $p < 0,05$), DcR1/TRAIL-R3 und DR5/TRAIL-R2 ($r = 0,6464$, $p < 0,0001$) sowie von DcR2/TRAIL-R4 und DR5/TRAIL-R2 ($r = 0,4659$, $p < 0,01$) auf. Proben mit starker DcR2/TRAIL-R4 Expression exprimierten dementsprechend ebenfalls stark DR5/TRAIL-R2 (Tabelle 21).

Tabelle 21: Korrelationen der Rezeptor-Expressionslevel untereinander.
Statistische Auswertung mittels Spearman Test.

Paar	<i>p</i> -Wert	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (r_s)
DcR1, DcR2	< 0,0001	0,5966
DcR1, DR4	0,0319	0,3357
DcR1, DR5	< 0,0001	0,6464
DcR2, DR4	0,1289	0,2411
DcR2, DR5	0,0028	0,4659
DR4, DR5	0,3448	-0,1557

3.1.3 Korrelation der TRAIL und TRAIL-Rezeptor Expression mit dem Überleben

Um die Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren als *outcome*-relevante Faktoren im FTC zu bewerten, wurde in univariaten Überlebensanalysen das Überleben von Patienten mit niedriger Expressionsstärke ($<$ Median) mit dem Überleben von Patienten mit hoher Expressionsstärke (\geq Median) verglichen und mithilfe des Log-Rank Tests auf Signifikanz geprüft (Abbildung 11). Ausreichende klinische Daten zum Gesamtüberleben standen von 38 Patienten zur Verfügung, das mediane Gesamtüberleben betrug 47 Monate (0 – 197 Monate). Angaben zum Rezidiv-freien Überleben lagen von 26 Patienten vor, im Median betrug es 43 Monate (2 – 137 Monate).

Es konnte ein signifikanter Effekt der DcR1/TRAIL-R3 Expressionsstärke auf die Überlebenszeit der Patienten festgestellt werden ($p < 0,05$).

Das Überleben bei hoher DcR1/TRAIL-R3 Expression lag im Median bei 68,0 Monaten, bei den Patienten mit niedriger DcR1/TRAIL-R3 Expression ist im

3 Ergebnisse

Beobachtungszeitraum im Sinne der Fragestellung kein Patient gestorben (HR = 6,04; 95% CI: 1,49 – 24,50). Ebenso wurde ein signifikanter Effekt der DcR1/TRAIL-R3 Expressionsstärke auf das rezidivfreie Überleben der Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom beobachtet ($p < 0,01$). Das rezidivfreie Überleben bei hoher Expression lag im Median bei 30,0 Monaten, bei niedriger Expression lag es im Median bei 109,0 Monaten (HR = 6,31; 95% CI: 1,63 – 24,48).

Patienten mit hoher Expression von DcR1/TRAIL-R3 hatten also eine signifikant kürzere Gesamt- und rezidivfreie Überlebenszeit und somit eine schlechtere Prognose.

Auch für DcR2/TRAIL-R4 korrelierte die Expressionsstärke signifikant invers mit der Überlebenszeit der Patienten ($p < 0,05$). Das Überleben bei hoher Expression lag im Median bei 68,0 Monaten. Von den Patienten mit niedriger Expression ist im Beobachtungszeitraum im Sinne der Fragestellung kein Patient gestorben (HR = 5,43; 95% CI: 1,41 – 20,99). Ebenso wurde ein signifikanter Effekt der DcR2/TRAIL-R4 Expressionsstärke auf das rezidivfreie Überleben der Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom beobachtet ($p < 0,05$). Das rezidivfreie Überleben bei hoher Expression lag im Median bei 36,0 Monaten. Unter den Patienten mit niedriger Expression trat kein Rezidiv auf (HR = 6,40; 95% CI: 1,39 – 29,44).

Patienten mit hoher Expression von DcR2/TRAIL-R4 hatten also eine signifikant kürzere Gesamt- und rezidivfreie Überlebenszeit und somit eine schlechtere Prognose.

Zusammenfassend identifizierten wir die Expressionen von DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 in der univariaten Überlebensanalyse als mögliche prädiktive Faktoren für die Prognose des FTC. Außerdem konnte ein signifikant negativer Einfluss grob-invasiven Wachstums gegenüber minimal-invasivem Wachstum auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (HR = 5,543; 95% CI: 1,37 – 22,41; $p < 0,05$).

3 Ergebnisse

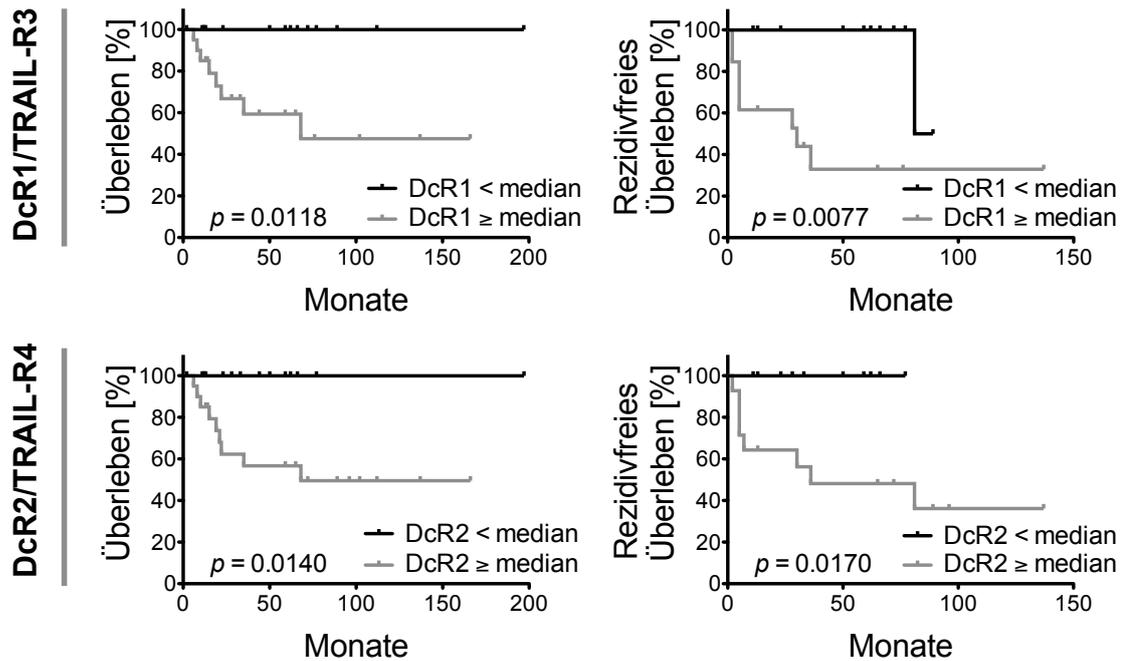


Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurven für Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben bezogen auf den IRS

Signifikanz der Unterschiede zwischen hoher (\geq Median) und niedriger ($<$ Median) Expression von DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4, berechnet mittels Log-Rank Test.

Im Anschluss an die univariaten Analysen diente die multivariate Cox-Regressionsanalyse der Identifizierung unabhängiger Prognosemarker für das FTC. Dafür wurde zunächst ein Regressionsbaum erstellt, welcher eine Hierarchisierung der einzelnen Parameter bezüglich ihrer Relevanz für das Überleben erlaubt (Abbildung 12). In dieser explorativen Analyse konnte DcR2/TRAIL-R4 als wichtigster Faktor für das Gesamtüberleben der Patienten des untersuchten Kollektivs nachgewiesen werden. Bei einem $\text{IRS} \geq 9,5$ für DcR2/TRAIL-R4 im Primärtumor wiesen die Patienten ein 3-fach höheres Mortalitätsrisiko auf. Als untergeordneter Risikofaktor bei niedriger DcR2/TRAIL-R4 Expression stellte sich die Expression von DcR1/TRAIL-R3 heraus. Bei diesen Patienten beeinflusst eine niedrige Expression von DcR1/TRAIL-R3 das Überleben positiv, bei hoher DcR1/TRAIL-R3 Expression $\geq 3,5$ ist das Alter bei Erstdiagnose (ED) entscheidend. Hohe DcR1/TRAIL-R3 Expression + Alter bei ED $\geq 64,5$ gehen mit einem 1,5-fach erhöhtem Mortalitätsrisiko einher. Dagegen haben Patienten mit hoher DcR1/TRAIL-R3 Expression und einem Alter bei ED $< 64,5$ kein erhöhtes Sterberisiko. Die Expression von DcR2/TRAIL-R4 und das Alter bei ED konnten entsprechend als bedeutendste Faktoren für das Mortalitätsrisiko von Patienten

3 Ergebnisse

mit FTC identifiziert werden. Der Regressionsbaum stellt eine rein explorative statistische Analyse dar und ermöglicht keine Aussagen über statistische Signifikanzen.

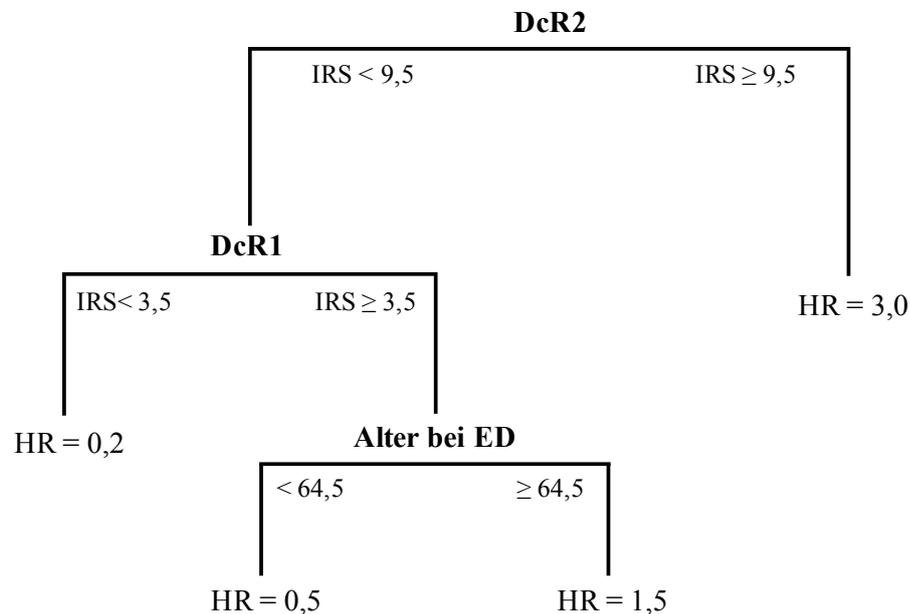


Abbildung 12: Überlebens-Regressionsbaum zur Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Mortalitätsrisiko.

HR = Hazard Ratio, IRS = Immunreaktiver Score, ED = Erstdiagnose

Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit positivem Lymphknotenstatus und Metastasierung ergaben sich für das UICC-Stadium sowie für das T-Stadium ähnliche Verteilungsmuster bezüglich der Sterberate, sodass eine Kombination beider Faktoren in einer Multivariaten Analyse nicht möglich war. Aufgrund des komplexen Charakters des UICC-Stadiums konzentrierten wir uns in der anschließenden Analyse auf dieses Merkmal. Die multivariate Cox-Analyse wurde zunächst mit allen Variablen durchgeführt und offenbarte eine hohe DcR2/TRAIL-R4 Expression (HR = 1,459, 95% CI = 1,047 - 2,034, $p = 0,026$) sowie hohes Alter bei ED (HR = 1,067, 95% CI = 1,004 - 1,135, $p = 0,038$) als unabhängige negative prognostische Marker für das Überleben von Patienten mit FTC. Die erneute Cox-Regression nach schrittweiser Variablen-Auswahl in Übereinstimmung mit den *Akaike information criterion* (AIC) verdeutlichte die Ergebnisse für die Risikofaktoren DcR2/TRAIL-R4 (HR = 1,427, 95% CI = 1,130 - 1,803, $p = 0,003$) und Alter bei ED Expression (HR = 1,080, 95% CI = 1,018 - 1,146, $p = 0,011$).

3 Ergebnisse

Die multivariate Analyse bestätigte also die Assoziation hoher DcR2/TRAIL-R4 Expressionen mit kürzerem Gesamtüberleben und identifizierte neben der DcR2/TRAIL-R4 Expression das Alter bei ED als unabhängigen prognostischen Marker für das FTC.

Tabelle 22: Univariate Überlebensanalyse

Variable	HR	CI (lower-upper 95 %)	p-Wert	
Alter bei ED	2.225	0.644 - 7.694	0.206	
Geschlecht	0.485	0.130 - 1.808	0.281	
T1/2 vs. T3/4	3.038	0.820 - 11.250	0.096	
UICC I/II vs. UICC III/IV	2.503	0.67 - 9.358	0.173	
Minimal vs. grob invasiv	8.428	1.378 - 22.300	0.016	*
DR4/TRAIL-R1	3.099	0.731 - 13.130	0.215	
DR5/TRAIL-R2	3.882	0.626 - 24.090	0.145	
DcR1/TRAIL-R3	6.041	1.490 - 24.500	0.012	*
DcR2/TRAIL-R4	5.787	1.410 - 22.990	0.016	*
TRAIL	0.401	0.088 - 1.817	0.236	

CI = confidence interval; HR = *Hazard Ratio*; ED = Erstdiagnose; UICC = Union international contre le cancer; * $p < 0,05$

Tabelle 23: Multivariate Überlebensanalyse

Variable	HR	CI (untere- obere 95 %)	p-Wert	
Alter bei ED	1.067	1.004 - 1.135	0.038	*
Geschlecht	0.578	0.080 - 4.199	0.588	
UICC I/II vs. UICC III/IV	0.496	0.039 - 6.329	0.590	
Minimal vs. grob invasiv	4.166	0.313 - 55.403	0.280	
DR4/TRAIL-R1	0.966	0.725 - 1.288	0.814	
DR5/TRAIL-R2	0.939	0.630 - 1.401	0.760	
DcR1/TRAIL-R3	1.108	0.842 - 1.458	0.464	
DcR2/TRAIL-R4	1.459	1.047 - 2.034	0.026	*
TRAIL	0.872	0.573 - 1.328	0.525	

CI = confidence interval; HR = *Hazard Ratio*; ED = Erstdiagnose; UICC = Union international contre le cancer; * $p < 0,05$

3 Ergebnisse

Tabelle 24: Multivariate Überlebensanalyse nach schrittweiser Variablenauswahl

Variable	HR	CI	p-Wert	
		(lower-upper 95 %)		
Alter bei ED	1.080	1.018 - 1.146	0.011	*
DcR2/TRAIL-R4	1.427	1.130 - 1.803	0.003	**

CI = confidence interval; HR = Hazard Ratio; ED = Erstdiagnose; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.2 Das TRAIL-System in der FTC Zelllinie TT2609-C02

Um das TRAIL-System als potenzielles therapeutisches Ziel im FTC zu untersuchen wurden Zellkulturversuche an der FTC Zelllinie TT2609-C02 durchgeführt. Diese umfassten zunächst die Expressionsanalyse verschiedener Mitglieder und Gegenspieler des TRAIL-Signalwegs auf RNA- und Proteinebene sowie eine genetische Analyse der Todesrezeptoren auf Mutationen. Im nächsten Schritt wurde dann die Wirkung von rekombinantem TRAIL alleine und in Kombination mit IAP-Inhibitoren auf die FTC Zellen untersucht.

3.2.1 RNA-Expression des TRAIL-Liganden und seiner Rezeptoren

Die RNA-Expression der TRAIL-Spleißvarianten und -Rezeptoren in der Zelllinie TT2609-C02 wurde mittels quantitativer *Real Time* PCR untersucht (Abbildung 13). Es konnte eine starke Expression des Liganden TRAIL- α (M = 3,82, SD = 1,26) sowie der Apoptose-vermittelnden Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 (M = 4,56, SD = 0,58) und DR5/TRAIL-R2 (TRICK2A: M = 2,33, SD = 0,64 und TRICK2B: M = 3,16, SD = 0,67) gezeigt werden. Die übrigen TRAIL-Spleißvarianten TRAIL- β (M = 1,35, SD = 1,26) und TRAIL- γ (M = 1,02, SD = 0,31) sowie die *decoy*-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 (M = 0,44, SD = 0,32) und DcR2/TRAIL-R4 (M = 1,22, SD = 0,31), waren im Vergleich zur Referenzprobe kaum verstärkt bzw. sogar stark vermindert exprimiert. Die statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis Test sowie Dunn's multiple comparison post hoc Test ergab signifikante Expressionsunterschiede lediglich zwischen den Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DcR1/TRAIL-R3; $p < 0,05$.

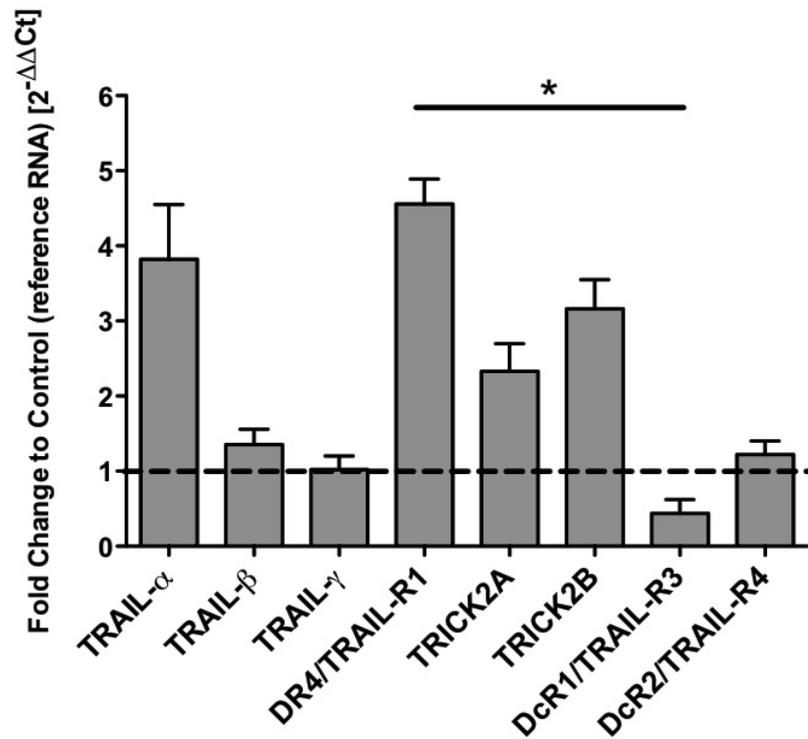


Abbildung 13: RNA-Expression des TRAIL-Liganden und seiner Rezeptoren.

Die relative RNA-Expression der Spleißvarianten des TRAIL-Liganden und seiner Rezeptoren, normalisiert zu GAPDH und bezogen auf die Kontrollprobe cDNA aus universeller humaner Referenz-RNA. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

3.2.2 Protein-Expression am TRAIL-Signalweg beteiligter Proteine

Die Grundexpression von TRAIL und seinen Rezeptoren sowie der *inhibitor-of-apoptosis* Proteine in der FTC Zelllinie TT2609-C02 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht.

Abbildung 14 zeigt die Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 sowie des TRAIL-Liganden. Die Zellen wiesen eine starke Grundexpression der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 auf. Die *decoy*-Rezeptoren, insbesondere DcR2/TRAIL-R4 konnten nur als schwache Expressionsbanden detektiert werden. Eine Detektion des TRAIL-Proteins war nicht möglich.

3 Ergebnisse

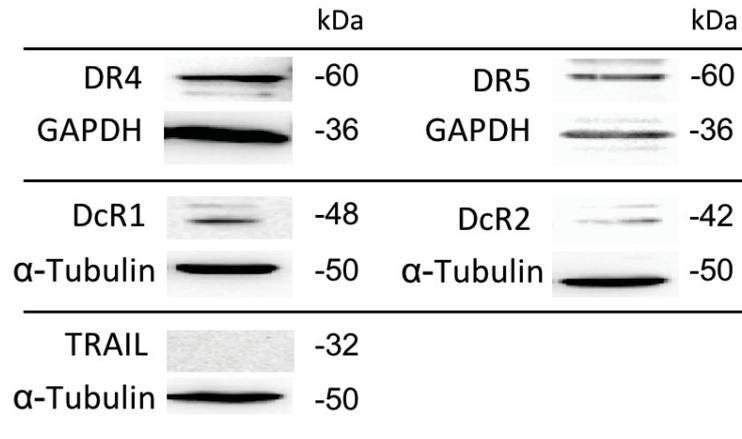


Abbildung 14: Proteinexpression von TRAIL-Ligand und -Rezeptoren in TT-2609-C02. Detektion mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle diente GAPDH oder α-Tubulin.

Weiterhin konnte in der Zelllinie TT2609-C02 eine starke Grundexpression der Apoptose-inhibitorischen Proteine Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 nachgewiesen werden (Abbildung 15).

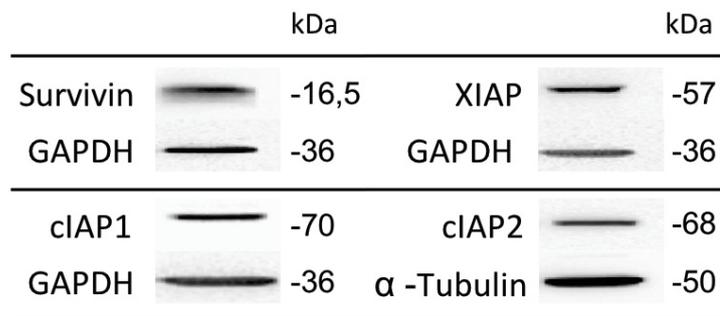


Abbildung 15: Proteinexpression der Apoptose-inhibitorischen Proteine in TT-2609-C02. Detektion mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle diente GAPDH oder α-Tubulin.

3.2.3 Mutationsanalyse der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2

Zur Untersuchung der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 auf Mutationen, welche für das unterschiedliche Resistenzverhalten von Tumorzellen gegenüber TRAIL verantwortlich sein können, wurde aus der Zelllinie TT2609-C02 DNA isoliert und mithilfe spezifischer Primer amplifiziert, um bestimmte

3 Ergebnisse

Genabschnitte zu sequenzieren. Die kodierende Region der Todesrezeptoren, welche auf Chromosom 8 in der Position p21-22 lokalisiert sind besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Dabei bilden die Exons 1-5 die extrazelluläre Domäne und das Exon 10 die intrazelluläre Todesdomäne (DD; *death domain*). Diese Exons wurden nach Literaturrecherche, aufgrund in anderen Malignomen beschriebener Polymorphismen und Mutationen, zur Sequenzierung ausgewählt.

Es wurden Veränderungen in der DNA des Rezeptors DR4/TRAIL-R1 gefunden. Im Exon 3 wurde eine *missense* Mutation im Nukleotid 422 identifiziert, die ein Guanin in ein Adenin tauscht (G422A), daraus resultiert in der Aminosäuresequenz der Ersatz eines Arginins durch ein Histidin. Außerdem identifizierten wir in Exon 4 eine *missense* Mutation im Nukleotid 626 mit dem Austausch eines Cytosins gegen ein Guanin (C626G), woraus der Ersatz eines Threonins durch ein Arginin resultierte. In Exon 5 wurde der Austausch eines Adenosins gegen ein Cytosin im Nukleotid 683 (A683C) festgestellt, mit der Folge der Substitution eines Glutamats durch ein Alanin (Abbildung 16).

Im ebenfalls analysierten Rezeptor DR5/TRAIL-R2 konnten in der Zelllinie TT2609-C02 keine Mutationen oder Polymorphismen identifiziert werden.

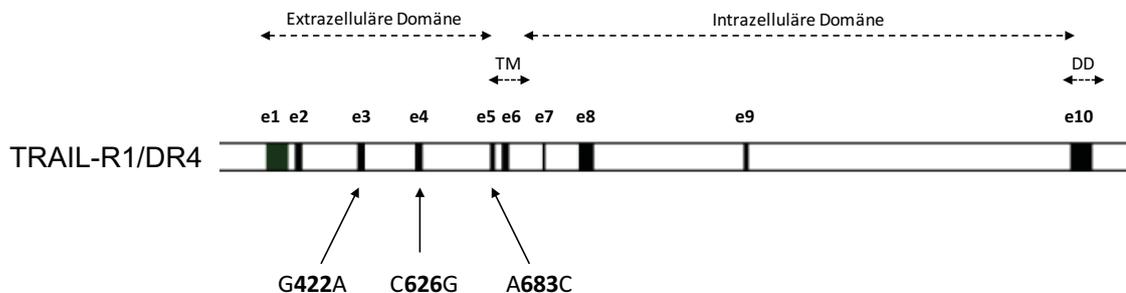


Abbildung 16: Mutationsanalyse des Rezeptors DR4/TRAIL-R1.

Exons (e1 - e10) sind als schwarze Rechtecke, Introns als weiße Rechtecke markiert. Proteindomänen sind als gestrichelte Pfeile gekennzeichnet (TM = Transmembrane Domäne, DD = *death domain*). Mit Pfeilen sind die gefundenen Sequenzvariationen in ihren Lokalisationen markiert.

3 Ergebnisse

3.2.4 Wirkung von rh-TRAIL auf FTC Zellen

Um den TRAIL-Signalweg als mögliches therapeutisches Ziel zu untersuchen wurde die Wirkung von rekombinantem humanen (rh-) TRAIL auf die FTC Zelllinie TT2609-C02 analysiert.

Mithilfe des CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay der Firma Promega erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit rh-TRAIL in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 0,1 - 300 ng/ml.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität nach Inkubation mit rh-TRAIL (Abbildung 17). Bei steigenden Wirkstoff-Konzentrationen sank die Zahl der am Stoffwechsel teilnehmenden Zellen. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) lag bei 27,7 ng/ml. Bei dieser Konzentration nahmen demnach 50 % der Zellen nicht mehr am ATP-Stoffwechsel teil.

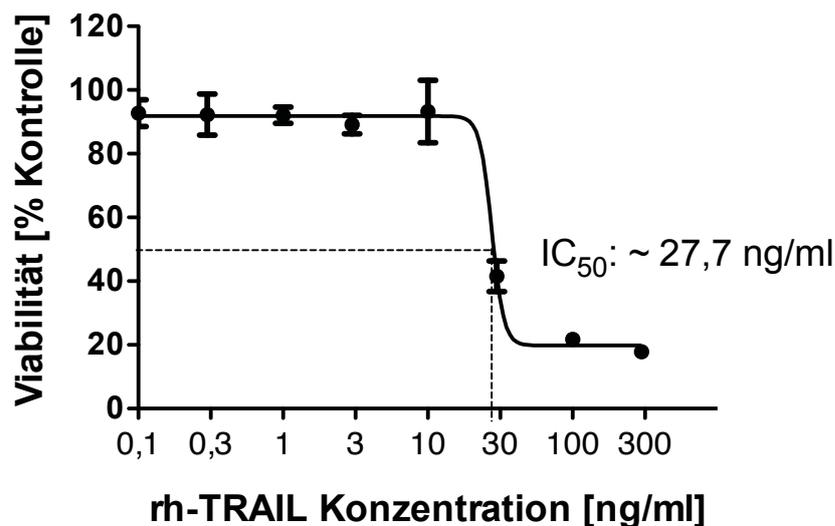


Abbildung 17: Zellviabilität von TT2609-C02 nach Behandlung mit rh-TRAIL.

Halblogarithmische Darstellung am Stoffwechsel teilnehmender Zellen (in % Kontrolle) nach Behandlung mit rh-TRAIL [0,1 ng/ml – 300 ng/ml] für 72 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifachbestimmung. IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration.

Zur Untersuchung einer Apoptose-Induktion durch rh-TRAIL wurde mittels FACS-Analyse der Anteil früh-apoptotischer (FITC+/PI-) und spät-apoptotischer (FITC+/PI+) Zellen der Linie TT2609-C02 nach Behandlung mit rh-TRAIL in den Konzentrationen 0,3, 1, 3, 10 ng/ml bestimmt. Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test

3 Ergebnisse

ergab einen signifikanten Effekt der rh-TRAIL-Behandlung auf die Anteile früh-apoptotischer FITC+/PI- Zellen (Abbildung 18 B; $p < 0,0001$), sowie spät-apoptotischer FITC+/PI+ Zellen (Abbildung 18 C; $p < 0,0001$). Fasst man beide Populationen zusammen, erhält man die Gesamtapoptoserate (Abbildung 18 D; $p < 0,0001$).

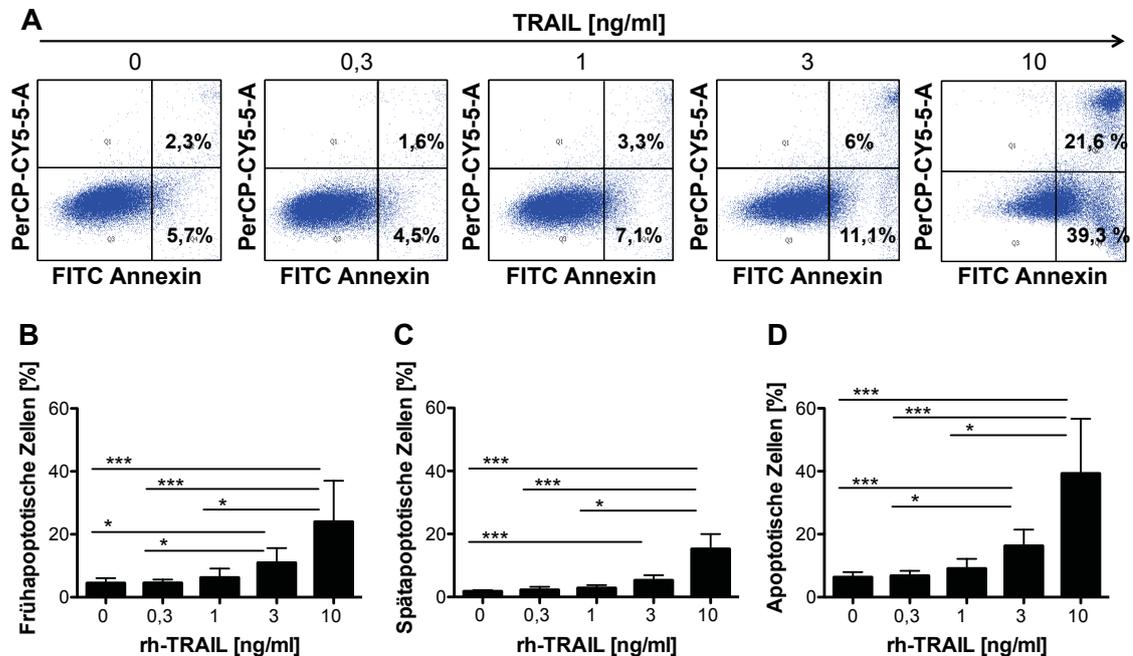


Abbildung 18: Apoptoseraten in TT2609-C02 nach Behandlung mit rh-TRAIL.

FACS-Analyse nach Behandlung mit 0,3, 1, 3, 10 ng/ml rh-TRAIL für 24 h im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle. **A** Repräsentatives Scatter Plot Ergebnis eines Experiments. **B-D** Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten für die frühe (**B**) und späte Apoptose (**C**) sowie Gesamtapoptose (**D**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Mithilfe des Dunn's multiple comparison post-hoc Tests erfolgte der Vergleich der Gesamtapoptoserate der einzelnen Behandlungsgruppen miteinander auf einen korrigierten α -Fehlerniveau (Tabelle 25). Hier zeigte sich, dass die rh-TRAIL-Konzentration 3 ng/ml eine signifikante Steigerung der Gesamtapoptoserate gegenüber der Lösungsmittel-Kontrolle ($p < 0,001$), sowie gegenüber 0,3 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,05$) bewirkte. Außerdem steigerte eine rh-TRAIL-Konzentration von 10 ng/ml die Gesamtapoptoserate signifikant gegenüber der Lösungsmittel-Kontrolle ($p < 0,001$) sowie gegenüber 0,3 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,001$) und 1 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

Tabelle 25: Unterschiede der Gesamtapoptoseraten nach rh-TRAIL-Behandlung.
Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn´s multiple comparison post hoc Test.

rh-TRAIL [ng/ml]	p-Wert	rh-TRAIL [ng/ml]	p-Wert
0 vs. 0,3	ns	0,3 vs. 3	*
0 vs. 1	ns	0,3 vs. 10	***
0 vs. 3	**	1 vs. 3	ns
0 vs. 10	***	1 vs.10	*
0,3 vs. 1	ns	3 vs. 10	ns

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant

3.2.5 Wirkung der IAP-Inhibitoren GDC-0152 und Birinapant auf FTC Zellen

Zum Erreichen einer Sensitivierung der Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose mit dem Ziel der Überwindung von Resistenzen bzw. einer Reduktion der erforderlichen Dosis sollte rh-TRAIL mit den IAP-Inhibitoren GDC-0152 und Birinapant kombiniert werden. Es wurde dafür zunächst der alleinige Effekt der einzelnen Substanzen auf die Zellviabilität und Apoptose in der Zelllinie TT2609-C02 untersucht.

Zellviabilität und Apoptose nach Behandlung mit GDC-0152

Die Ergebnisse des Viabilitätsassays nach Behandlung mit dem IAP-Inhibitor GDC-0152 in den Konzentrationen 3 nM bis 10 μ M ergaben keine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Viabilität der Zellen der Linie TT2609-C02 (Abbildung 19).

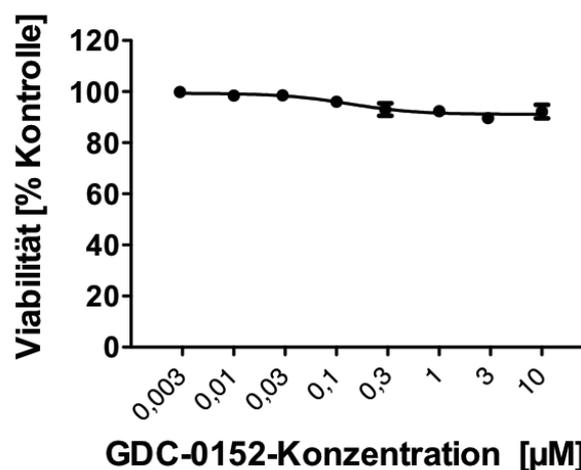


Abbildung 19: Zellviabilität nach Behandlung mit GDC-0152.

Halblogarithmisch aufgetragen ist der prozentuale Anteil am Stoffwechsel teilnehmender Zellen nach Behandlung mit GDC-0152 [3 nM – 10 μ M] für 72 h. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifachbestimmung.

3 Ergebnisse

Zur Messung der apoptotischen Wirkung von GDC-0152 dienten FACS-Analysen mit FITC Annexin und Propidiumiodid Färbung von TT2609-C02 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1, 3, 10 μM GDC-0152 (Abbildung 20). Es zeigten sich im Kruskal-Wallis Test weder signifikante Unterschiede der früh-apoptotischen FITC+/PI- Population (Abbildung 20 B) noch der spät-apoptotischen FITC+/PI+ Population (Abbildung 20 C). Dementsprechend fanden sich zusammengefasst keine signifikanten Unterschiede der Gesamtapoptoserate (Abbildung 20 D) nach der Behandlung mit GDC-0152 in aufsteigenden Konzentrationen und somit keine apoptotische Wirkung des IAP-Inhibitors auf die Zellen der Linie TT2609-C02.

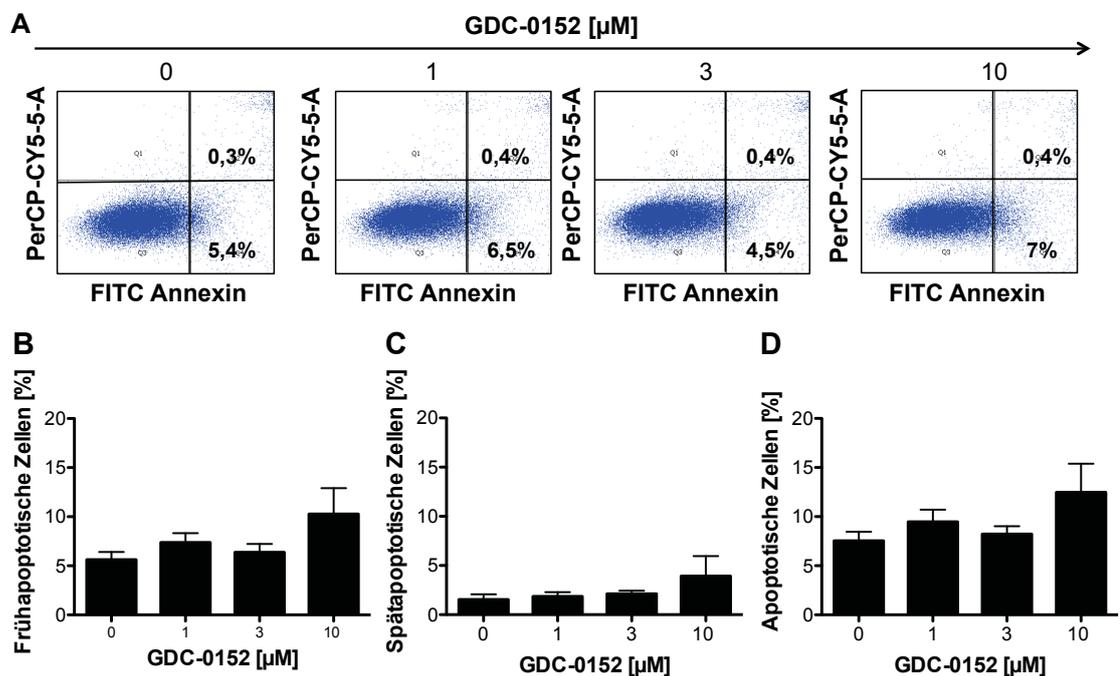


Abbildung 20: Apoptoseraten nach Behandlung mit GDC-0152.

FACS-Analyse nach Behandlung mit 1, 3, 10 μM GDC-0152 für 24 h im Vergleich zur Kontrolle (Lösungsmittel). **A** Exemplarische Scatter Plot Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. **B-D** Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten für frühe Apoptose (**B**), späte Apoptose (**C**) und Gesamtapoptose (**D**).

Zellviabilität und Apoptose nach Behandlung mit Birinapant

Die Ergebnisse des Viabilitätsassays nach Behandlung mit Birinapant in den Konzentrationen 3 nM bis 10 μM ergaben keine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Viabilität der Zellen der Linie TT2609-C02 (Abbildung 21).

3 Ergebnisse

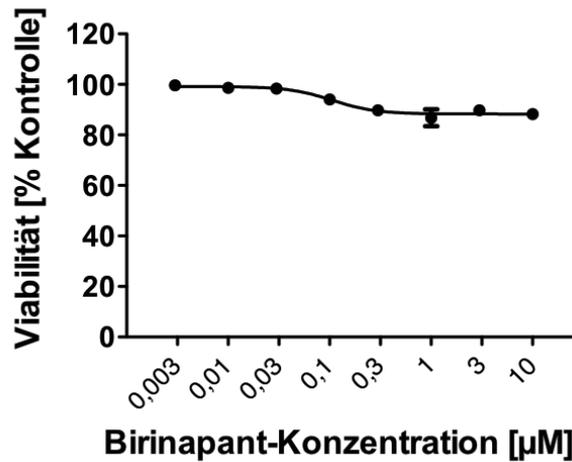


Abbildung 21: Zellviabilität nach Behandlung mit Birinapant.

Halblogarithmisch aufgetragen ist der prozentuale Anteil am Stoffwechsel teilnehmender Zellen nach Behandlung mit Birinapant [3 nM – 10 µM] für 72 h. Mittelwerte und Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifachbestimmung.

In der FACS-Analyse zur Testung der apoptotischen Wirkung von Birinapant zeigten sich weder signifikante Unterschiede der früh-apoptotischen FITC+/PI- Population (Abbildung 22 B) noch der spät-apoptotischen FITC+/PI+ Population (Abbildung 22 C). Dementsprechend fanden sich zusammengefasst keine signifikanten Unterschiede der Gesamtaoptoserate (Abbildung 22 D) nach der Behandlung mit Birinapant in aufsteigenden Konzentrationen und somit keine apoptotische Wirkung des Smac-Mimetikums auf die Zellen der Linie TT2609-C02.

3 Ergebnisse

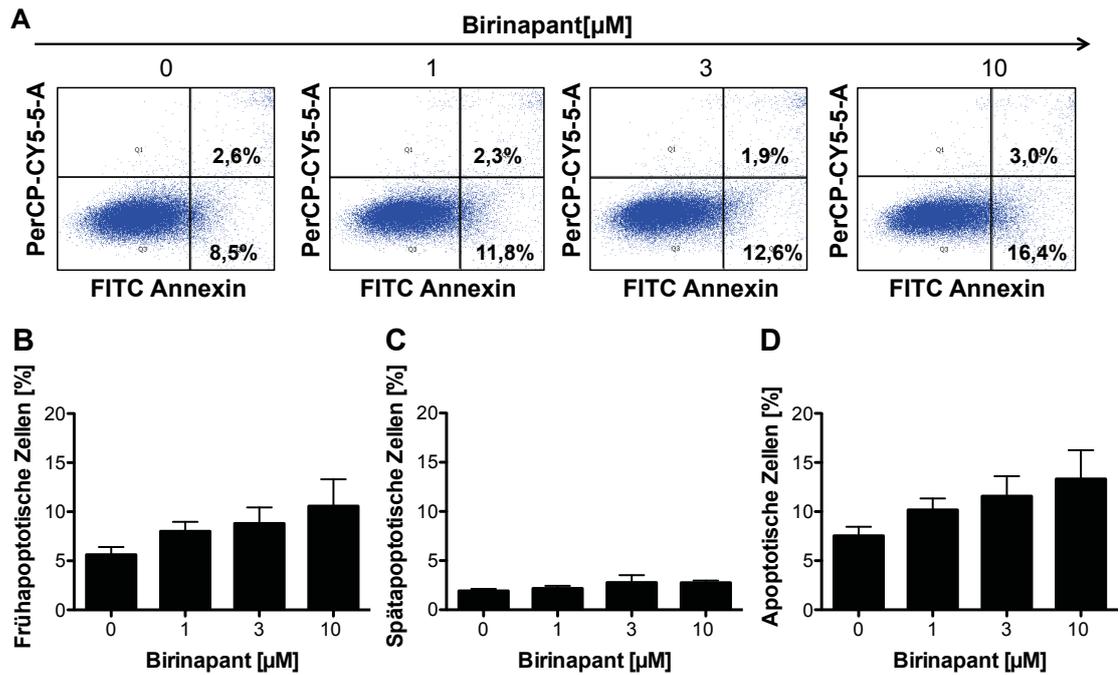


Abbildung 22: Apoptoseraten nach Behandlung mit Birinapant.

FACS-Analyse nach Behandlung mit 1, 3, 10 µM Birinapant für 24 h im Vergleich zur Kontrolle (Lösungsmittel). **A** Exemplarische Scatter Plot Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. **B-D** Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten für frühe Apoptose (**B**), späte Apoptose (**C**) und Gesamtapoptose (**D**).

3.2.6 Wirkung der Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und IAP-Inhibitoren auf FTC Zellen

Nach Auswertung der alleinigen Effekte von rh-TRAIL sowie den Smac-Mimetika GDC-0152 und Birinapant auf die Zellen erfolgte die kombinierte Behandlung zur Untersuchung eines möglichen sensitivierenden Effektes.

Um einen sensitivierenden Effekt möglichst gut darstellen zu können wurden mit 0,3, 1 und 3 ng/ml rh-TRAIL und 1 µM GDC-0152 bzw. Birinapant niedrige Konzentrationen mit sehr geringen alleinigen funktionellen Effekten gewählt.

Zellviabilität und Apoptose nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152

Die Zellviabilität nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152 wurde mithilfe des CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay bestimmt. Der zu erwartende additive Effekt der kombinierten Behandlung auf die Zellviabilität wurde errechnet und mit dem gemessenen Effekt verglichen. Die Differenz wurde als *Fractional Product* nach Webb *et al.* angegeben und ist ein Maß für die Sensitivierung

3 Ergebnisse

[172]. Werte größer 0,1 werden als relevante Sensitivierung angesehen. Die Signifikanz der Viabilitätsunterschiede wurde außerdem mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests geprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass die gemessene Zellviabilität nach kombinierter Behandlung mit TRAIL und GDC-0152 unter der durch additive Effekte der Einzelsubstanzen erwarteten Viabilität lag. Bei einer Kombination von 10 ng/ml TRAIL + 1 μ M GDC-0152 konnte, verglichen mit dem erwarteten additiven Effekt ein signifikant geringeres Überleben gemessen werden ($p < 0,01$, FP = 0,3; Abbildung 23).

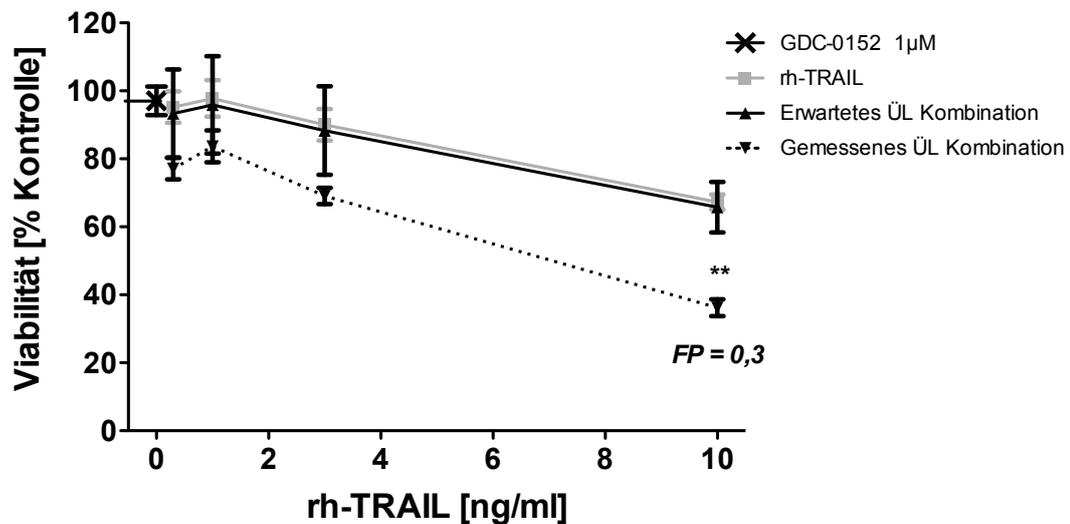


Abbildung 23: Zellviabilität nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152.

Prozentualer Anteil lebender Zellen nach Behandlung mit 0,3, 1, 3 und 10 ng/ml rh-TRAIL +/- GDC-0152 1 μ M für 72 Stunden. Mittelwerte und Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifachbestimmung. FP = *Fractional Product*; ** $p < 0,01$.

Zur weiteren Untersuchung eines sensitivierenden Effektes der Ko-Inkubation von rh-TRAIL mit dem IAP-Inhibitor GDC-0152 wurden mittels FACS-Analyse die Anteile apoptotischer Zellen nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152 sowie nach alleiniger Behandlung mit rh-TRAIL bestimmt und verglichen (Abbildung 24).

3 Ergebnisse

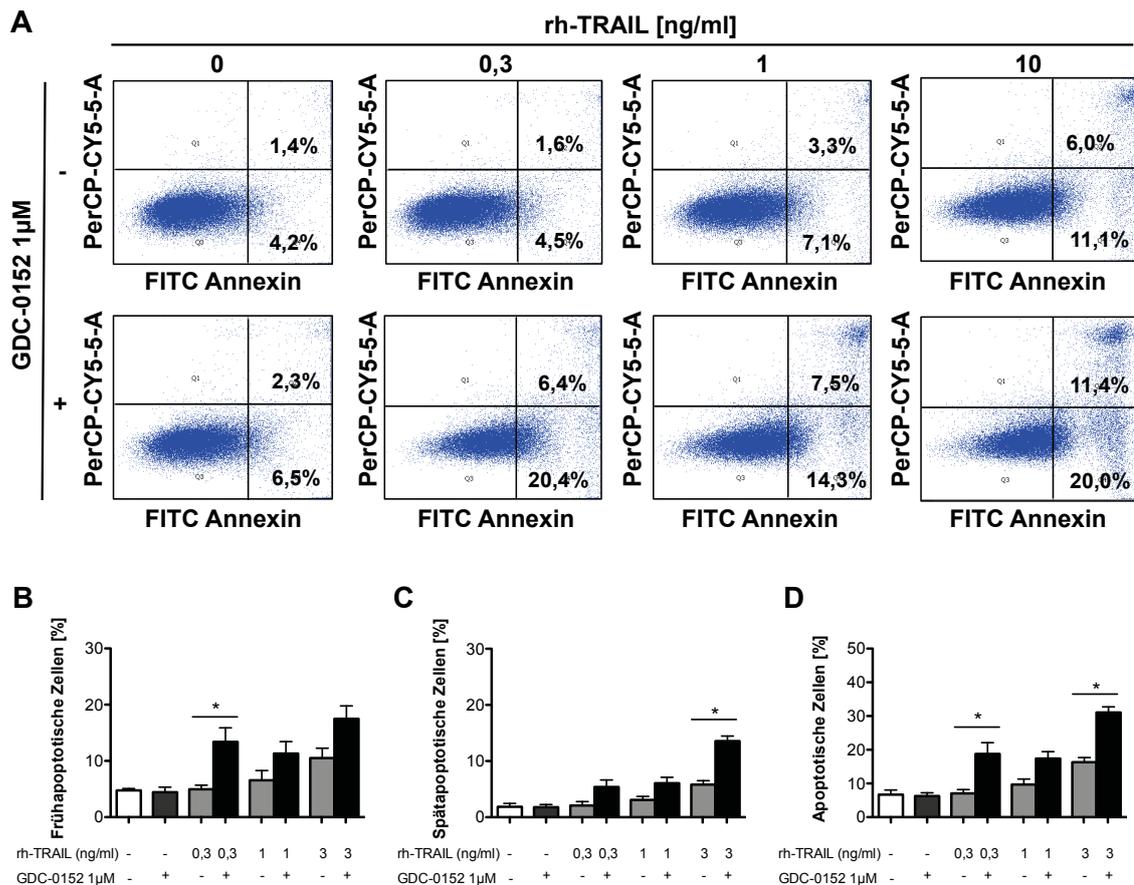


Abbildung 24: Apoptoseraten nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und GDC-0152.

FACS-Analyse nach Behandlung mit 0,3, 1 und 3 ng/ml TRAIL +/- 1 µM GDC-0152 für 24 Stunden im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle. **A** Exemplarische Scatter Plot Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. **B-D** Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten für frühe Apoptose (**B**), späte Apoptose (**C**) und Gesamtapoptose (**D**). * $p < 0,05$.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Anteile früh-apoptotischer FITC+/PI- Zellen (Abbildung 24 B), sowie spät-apoptotischer FITC+/PI+ Zellen (Abbildung 24 C). Fasst man beide Populationen zusammen, erhält man die Gesamtapoptoserate (Abbildung 24 D). Für diese ergaben sich signifikante Sensitivierungen durch die Kombination von 1 µM GDC-0152 + 0,3 ng/ml rh-TRAIL gegenüber 0,3 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,05$), sowie die Kombination von 1 µM GDC-0152 + 3 ng/ml rh-TRAIL gegenüber 3 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,05$).

Bestätigend zu den Ergebnissen aus dem MTS-Assay konnte somit auch in der FACS-Analyse ein sensitivierender Effekt des Smac-Mimetikums GDC-0152 auf die TRAIL-induzierte Apoptose nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

Zellviabilität und Apoptose nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und Birinapant

Auch für die Kombination von rh-TRAIL und Birinapant konnte im Viabilitätsassay ein synergistischer sensitivierender Effekt nachgewiesen werden. Das nach Ko-Inkubation gemessene Überleben lag deutlich unter dem durch additive Effekte der Einzelsubstanzen erwarteten Überleben (Abbildung 25). Die Behandlung mit 3 ng/ml rh-TRAIL + 1 μ M Birinapant bewirkte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität verglichen mit dem erwarteten additiven Effekt ($p < 0,01$, FP = 0,47). Gleiches gilt für die Inkubation mit 10 ng/ml rh-TRAIL + 1 μ M Birinapant gegenüber dem erwarteten additiven Effekt ($p < 0,01$, FP = 0,42).

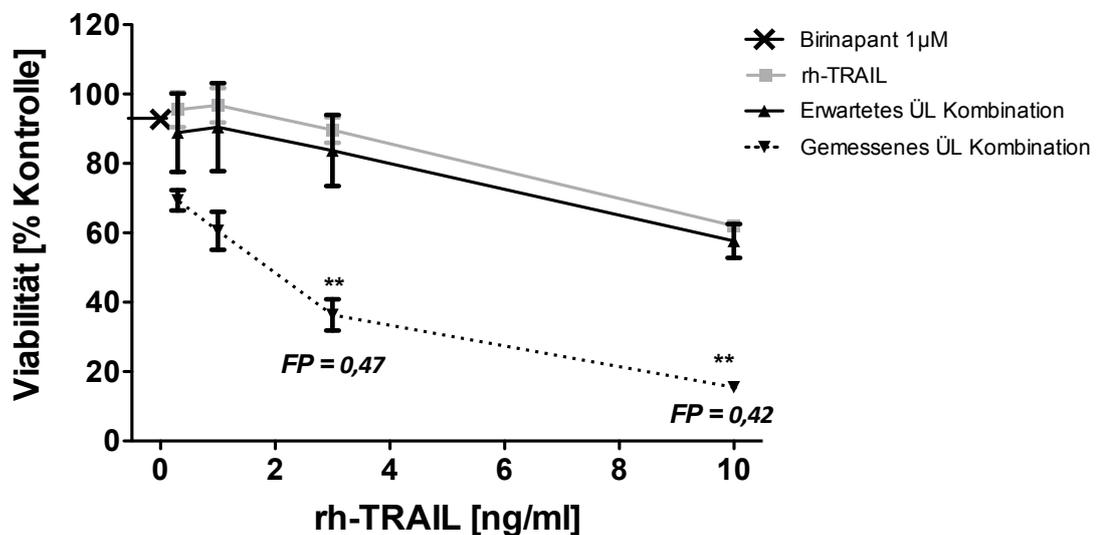


Abbildung 25: Zellviabilität nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und Birinapant.

Prozentualer Anteil lebender Zellen nach Behandlung mit 0,3, 1, 3 und 10 ng/ml rh-TRAIL +/- Birinapant 1 μ M für 72 Stunden. Mittelwerte und Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifachbestimmung. FP = *Fractional Product*; ** $p < 0,01$.

Zur weiteren Untersuchung eines sensitivierenden Effektes wurden auch nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und dem Smac-Mimetikum Birinapant mittels FACS-Analyse die Anteile apoptotischer Zellen bestimmt und mit der alleinigen TRAIL-Behandlung verglichen (Abbildung 26).

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten sensitivierenden Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Anteile früh-apoptotischer FITC+/PI- Zellen (Abbildung 26 B) sowie spät-apoptotischer FITC+/PI+ Zellen (Abbildung 26 C). Signifikante Sensitivierungen der Gesamtaoptoserate ergaben sich durch die

3 Ergebnisse

Kombination von 1 μM Birinapant + 0,3 ng/ml rh-TRAIL gegenüber 0,3 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,05$), sowie durch Behandlung mit 1 μM Birinapant + 1 ng/ml rh-TRAIL verglichen mit 1 ng/ml rh-TRAIL ($p < 0,05$). Auch die Kombination von 1 μM Birinapant + 3 ng/ml rh-TRAIL induzierte gegenüber der alleinigen Behandlung mit rh-TRAIL 3 ng/ml signifikant höhere Apoptoseraten ($p < 0,05$).

Bestätigend zu den Ergebnissen aus dem MTS-Assay konnte somit auch in der FACS-Analyse ein sensitivierender Effekt des IAP-Inhibitors Birinapant auf die TRAIL-vermittelte Apoptose nachgewiesen werden.

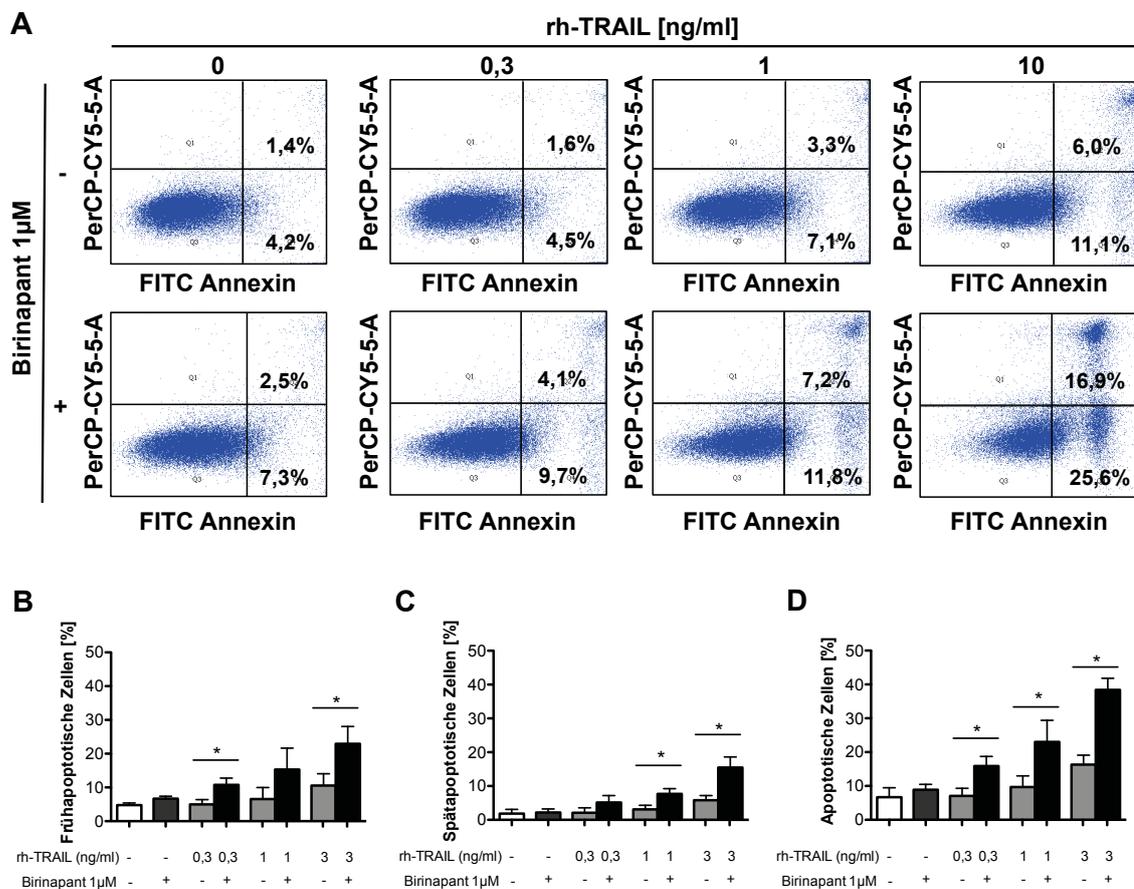


Abbildung 26: Apoptoseraten nach Ko-Inkubation mit rh-TRAIL und Birinapant.

FACS-Analyse nach Behandlung mit 0,3, 1 und 3 ng/ml rh-TRAIL +/- 1 μM Birinapant für 24 Stunden im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle. **A** Exemplarische Scatter Plot Ergebnisse einesrepräsentativen Experiments. **B-D** Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten für frühe Apoptose (**B**), späte Apoptose (**C**) und Gesamtpoptose (**D**). * $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.2.7 Wirkung der IAP-Inhibitoren GDC-0152 und Birinapant auf die Expression der *inhibitor-of-apoptosis* Proteine

Zur weiteren Untersuchung verantwortlicher Mechanismen für den sensitivierenden Effekt von GDC-0152 und Birinapant wurde die Protein-Expression verschiedener Mitglieder aus der Familie der Apoptose-inhibitorischen Proteine in der Zelllinie TT2609-C02 nach Inkubation mit GDC-0152 und Birinapant im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen mittels Western Blot untersucht (Abbildung 27). Außerdem wurden Western Blot Analysen für PARP (*Poly ADP ribose polymerase*) und sein Spaltprodukt *Cleaved-PARP* als Zeichen einer *Compound*-vermittelten Apoptose durchgeführt. Nach Behandlung mit GDC-0152 konnte eine deutlich verminderte Proteinexpression des Apoptose-Inhibitors cIAP1 und schwächer ausgeprägt auch von cIAP2 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Es gab keinen eindeutigen Expressionsunterschied des Proteins XIAP. Auch konnte keine Spaltung von PARP nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit Birinapant war ebenfalls eine deutlich verminderte Expression von cIAP1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu sehen. Außerdem erschien cIAP2 vor allem bei der höchsten Birinapant-Konzentration von 10 μM vermindert exprimiert. Eine PARP-Spaltung induzierte auch Birinapant nicht.

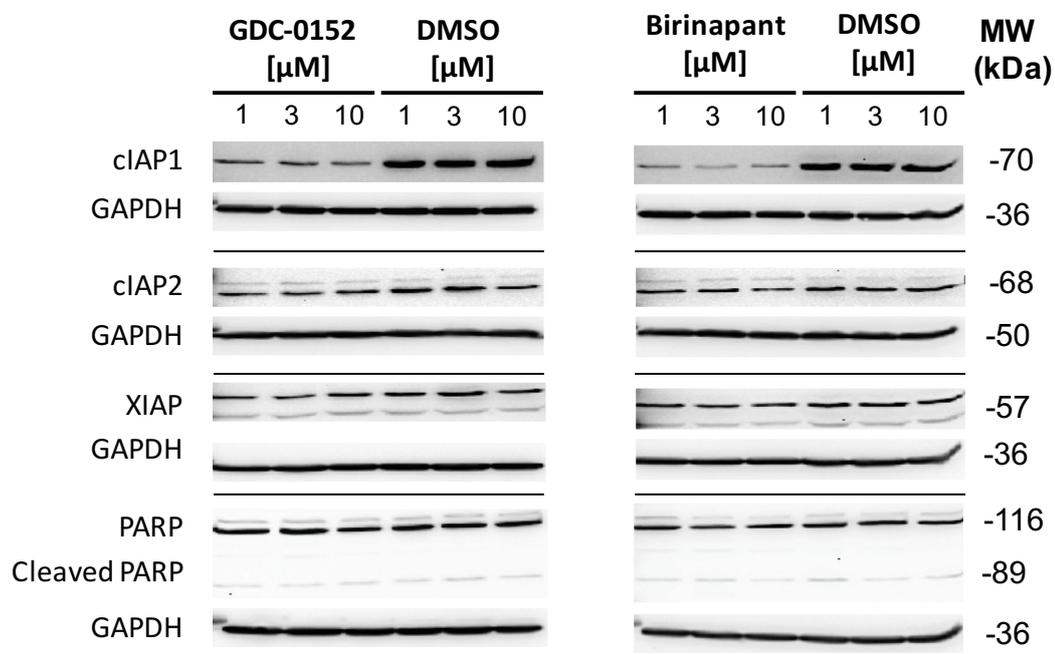


Abbildung 27: Expression der IAPs sowie von PARP und seinem Spaltprodukt nach Behandlung mit GDC-0152 oder Birinapant in TT-2609-C02.

Detektion der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP sowie PARP und seines Spaltprodukts mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Die Negativkontrolle erfolgte durch Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO.

4 Diskussion

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom ist der zweithäufigste maligne Tumor der Schilddrüse und betrifft vor allem Frauen im mittleren Lebensalter. Mit operativer Resektion und ablativer Radiojodtherapie stehen etablierte Therapieoptionen zur Verfügung, welche zusammen mit verbesserten diagnostischen Möglichkeiten zur Früherkennung eine insgesamt günstige Prognose der differenzierten Schilddrüsenkarzinome bedingen. Eine Ausnahme bilden Patienten mit Fernmetastasen, welche zusätzlich eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit ¹³¹Iod durch einen Verlust der Radiojod-Speicherfähigkeit aufweisen. Diese Patienten haben eine drastisch reduzierte Prognose mit einer krankheitsspezifischen 10-Jahres-Überlebensrate von nur noch 10 % [13]. Entsprechend notwendig ist es, mögliche alternative Therapieansätze für diese Subpopulation der Schilddrüsenkarzinom-Patienten zu untersuchen.

Die Bedeutung des TRAIL-Systems als therapeutisches Ziel in der Krebs-Therapie wird seit seiner Entdeckung als Mitglied der TNF-Superfamilie 1995 mit selektiver Apoptose-Induktion in Tumorzellen in zahlreichen Publikationen untersucht und diskutiert. Trotz vielversprechender präklinischer Studien konnten daraufhin entwickelte rekombinante TRAIL-Moleküle und TRAIL-Rezeptor-Agonisten (TRA) alleine oder in der Kombination mit Chemotherapie in ersten klinischen Studien in verschiedenen soliden und hämatologischen Malignomen bisher keine signifikanten Vorteile gegenüber der konventionellen Chemotherapie erbringen. Ursächlich hierfür sind vorhandene oder erworbene Resistenzmechanismen der Tumorzellen auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion. Es gilt daher, diejenigen Strukturen zu identifizieren, die für die Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber dem TRAIL-Signal verantwortlich sind, um diese gezielt anzusteuern und so das TRAIL-System in Zukunft erfolgreich therapeutisch nutzen zu können.

4.1 Die Bedeutung des TRAIL-Systems in follikulären Schilddrüsenkarzinomen

Die Bedeutung des TRAIL-Systems in Schilddrüsenkarzinomen ist bisher wenig untersucht, obwohl bereits 1997 Bretz *et al.* die Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren in normalen sowie entarteten Thyreozyten nachweisen konnten [179].

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es nun, anhand von Gewebeproben die Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren im follikulären Schilddrüsenkarzinom und korrespondierenden nicht-neoplastischem Schilddrüsengewebe zu vergleichen und mit klinischen Merkmalen und dem Überleben zu korrelieren. Anhand der FTC Zelllinie TT2609-C02 wurde anschließend der funktionelle Effekt von TRAIL alleine und in Kombination mit IAP-Inhibitoren untersucht.

4.1.1 DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 sind Biomarker für eine schlechte Prognose im follikulären Schilddrüsenkarzinom

TRAIL ist der Ligand in der TNF-Familie mit der höchsten Rezeptorvariabilität [180]. Er kann an zwei Todesrezeptoren sowie an drei regulatorische Rezeptoren binden. Diese Vielfalt legt nahe, dass die Aktivierung der Todesrezeptoren eine Schlüsselstelle in der Regulation der TRAIL-Sensitivität und damit der Empfindlichkeit einer Tumorzelle für den TRAIL-assoziierten Zelltod ist.

Unserem Wissen nach existieren bisher keine Daten zur Korrelation zwischen der Expression des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems und klinisch-pathologischen Daten im follikulären Schilddrüsenkarzinom. Die Analyse der Expression des TRAIL-Systems diene als erster Schritt zur Evaluation des TRAIL-Systems als potentielle therapeutische Zielstruktur. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren in Tumorproben und korrespondierendem nicht-neoplastischem Schilddrüsengewebe von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom untersucht. Grundlage bildeten immunhistochemische Untersuchungen eines TMA mit Gewebeproben von 44 Patienten. Es fiel zunächst eine signifikant stärkere Expression aller TRAIL-Rezeptoren sowie des Liganden im Tumor, verglichen mit dem korrespondierenden Normalgewebe der Patienten auf. Dies bestätigt Ergebnisse von Mitsiades *et al.*, welche eine breite Expression des TRAIL-Systems im Tumorgewebe verschiedener Schilddrüsenkarzinome berichteten [181] und weist auf eine bedeutende Rolle des TRAIL-Systems im follikulären Schilddrüsenkarzinom hin. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression sowohl der *decoy*-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 als auch des Todesrezeptors DR5/TRAIL-R2 mit einem höheren Tumorstadium assoziiert ist. So ergaben die statistischen Auswertungen eine signifikant stärkere Expression von DcR1/TRAIL-R3 in Tumorproben mit hohem T-Stadium (T3/4) sowie hohem UICC-Stadium (UICC III/IV). Für DcR2/TRAIL-R4 konnte neben

4 Diskussion

der Korrelation mit hohem T- und UICC-Stadium zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang mit grob-invasivem Wachstum beobachtet werden. Auch DR5/TRAIL-R2 zeigte eine signifikant stärkere Expression in Proben von Patienten mit dem Tumorstadium T 3/4 oder UICC III/IV, verglichen mit Proben aus T 1/2 und UICC I/II Tumoren. Durch Kategorisierung der Expressionsstärken in niedrig ($<$ Median) und hoch (\geq Median) konnte in der univariaten Überlebensanalyse für die beiden *decoy*-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 eine Assoziation von hoher Expression mit kürzerem Gesamtüberleben, sowie mit kürzerem rezidivfreien Überleben gezeigt werden.

Aufgrund der Patientendaten war eine multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben nicht möglich, sodass diese nur für das Gesamtüberleben durchgeführt wurde. In der abschließenden multivariaten Analyse für das Gesamtüberleben konnte DcR2/TRAIL-R4 als unabhängiger negativer prognostischer Marker bestätigt werden, was die Relevanz des TRAIL-Systems und insbesondere des *decoy*-Rezeptors DcR2/TRAIL-R4 für die Prognose von FTC Patienten unterstreicht.

Vergleichbaren Studien zu Schilddrüsenkarzinomen gibt es bislang nicht, unsere Ergebnisse sind jedoch im Einklang mit einer Reihe von Arbeiten zu anderen Tumorentitäten. Ganten *et al.* untersuchten das TRAIL-System in Brustkrebs-Patientinnen und fanden ebenfalls eine stärkere Expression im Tumor- als im Normalgewebe sowie eine Korrelation hoher Expressionen von DR5/TRAIL-R2 und DcR2/TRAIL-R4 mit hohem Tumorstadium und positivem Lymphknotenstatus [57]. Cooper *et al.* bestätigten in Untersuchungen zum Rezeptor DR5/TRAIL-R2 in Lungenkarzinomen (NSCLC) ebenfalls die stärkere Expression im Tumor gegenüber Normalgewebe. Auch konnte eine hohe Expression mit geringerem Differenzierungsgrad sowie schlechterem Gesamtüberleben assoziiert werden. Unter Rauchern war eine hohe DR5/TRAIL-R2 Expression sogar ein unabhängiger Marker für kürzeres Überleben [182]. In Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde die Kombination aus niedrigem DR4/TRAIL-R1 mit hohem DcR1/TRAIL-R3 mit kürzerem progressionsfreien Überleben sowie schlechterem Therapieansprechen in Verbindung gebracht [58]. Ähnliche Ergebnisse für DcR1/TRAIL-R3 konnten in malignen Zellen bei akuter myeloischer Leukämie erzielt werden [98]. Mechanistische Erklärungsansätze zielen vornehmlich auf die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren ab. Weit verbreitet ist die Auffassung, dass die *decoy*-

4 Diskussion

Rezeptoren Zellen vor einem Apoptosesignal schützen, indem sie zum einen TRAIL-Moleküle kompetitiv „abfangen“, welche somit nicht mehr zur Apoptoseinduktion über die Todesrezeptoren zur Verfügung stehen. Zum anderen scheint über die trunkierte intrazelluläre Domäne von DcR2/TRAIL-R4 zusätzlich eine Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B möglich zu sein [51, 59]. NF- κ B seinerseits aktiviert die Transkription einiger überlebensfördernder Proteine und erhöht beispielsweise die Expression von cIAP2, welches nicht mehr degradiert wird und seine anti-apoptotische Wirkung entfalten kann [133]. Auch Lalaoui *et al.* bestätigten in ihren Untersuchungen an Zervixkarzinomzellen, dass DcR2/TRAIL-R4 nach Bindung von TRAIL Signalwege aktivieren kann, welche Zellüberleben und Proliferation fördern und somit zur Karzinogenese beitragen [97].

Mehr Fragen wirft die in dieser Arbeit gezeigte und ebenfalls in der Literatur beschriebene Korrelation des Todesrezeptors DR5/TRAIL-R2 mit fortgeschrittenem Tumorstadium auf. Erwartungsgemäß würde eine hohe Todesrezeptorexpression zur verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von Caspasen und somit zu vermehrtem Zellsterben führen. Erklärungen bieten verschiedene Studien, welche eine Interaktion von DcR2/TRAIL-R4 mit DR5/TRAIL-R2 als entscheidenden Mechanismus zur Kontrolle des apoptotischen Signals durch DcR2/TRAIL-R4 beschreiben. So bestreiten Clancy *et al.* eine reine „Fänger“-Funktion des *decoy*-Rezeptors und zeigten, dass DcR2/TRAIL-R4 selbst nur eine geringe Affinität für die Bindung von TRAIL besitzt, dass aber eine Interaktion von DcR2/TRAIL-R4 und DR5/TRAIL-R2 zur Ausbildung nicht-funktionsfähiger Heterotrimere und zur Herabsetzung der Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber TRAIL führt. Sie zeigten auch, dass diese Interaktion Ligand-unabhängig über *preligand assembly domains* (PLAD) vermittelt wurde und stärker war als homo-spezifische Interaktionen. Sie stellten daher die These einer DcR2/TRAIL-R4-vermittelten Regulation der TRAIL-Sensitivität über Interaktion mit DR5/TRAIL-R2 auf [183]. Auch Merino *et al.* unterstützten die Theorie der Interaktion zwischen DcR2/TRAIL-R4 und DR5/TRAIL-R2, welche zur Formierung eines DISC ohne Fähigkeit zur Caspasen-Aktivierung führt [99].

Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen die Assoziation hoher *decoy*-Rezeptor Expression mit hohem Tumorstadium sowie schlechterem Überleben. Außerdem konnte auch in dieser Arbeit die von Clancy *et al.* und Merino *et al.* beschriebene positive Korrelation zwischen den Expressionen von DR5/TRAIL-R2 und DcR2/TRAIL-R4

4 Diskussion

bestätigt werden. Die mögliche Interaktion von DcR2/TRAIL-R4 und DR5/TRAIL-R2 könnte die von uns gezeigte Korrelation hoher DR5/TRAIL-R2 Expressionen mit fortgeschrittenem Tumorstadium erklären. Einen weiteren Erklärungsansatz dafür, dass es trotz des Nachweises einer Todesrezeptorexpression zu Resistenzen kommt liefern Publikationen, welche eine Endozytose des Todesrezeptors nach intrazellulär und damit seinen Verlust an der Zelloberfläche für das Entkommen vor dem Apoptosesignal verantwortlich machen [184, 185]. Außerdem untersuchten mehrere Arbeiten eine mögliche Induktion antiapoptotischer Signale durch Bindung von TRAIL an Todesrezeptoren. Durch die RIPK-1 abhängige Ausbildung alternativer Komplexe kann es demnach zur Aktivierung verschiedener Kinasen wie NF- κ B [40, 82] *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) [89], p38 [90, 91] und *Extracellular-signal Regulated Kinase-1* und *-2* (ERK1/2) [92] mit Überlebens-, Proliferations- und Migrationsfördernden Effekten kommen. Es ist aktuell noch unklar, wovon abhängig ist, ob die apoptotische oder antiapoptotische Kaskade in Gang gesetzt wird und wie genau die molekularen Mechanismen sind. Diese zu erforschen ist aufgrund von Interaktionen zwischen den Kinasen und Zelltyp-spezifischen Faktoren schwierig, jedoch notwendig zur Identifizierung von Patienten, welche nicht von einer TRAIL-basierten Therapie profitieren, sondern durch unerwünschte Effekte eventuell sogar Schaden nehmen könnten. Außerdem könnte die Kenntnis der verantwortlichen Strukturen als Stellglied genutzt werden, um das TRAIL-Signal in apoptotische Bahnen zu lenken.

Erwähnt werden muss ebenfalls, dass Ergebnisse weiterer Arbeiten zur prognostischen Relevanz der TRAIL-Rezeptoren teils gegenteilige Aussagen treffen. In Pankreaskarzinomen beispielsweise wurde ein Verlust der DR5/TRAIL-R2 Expression im Tumor mit schlechter Prognose korreliert [186], was durch die Annahme, dass ein Verlust des Todesrezeptors die Zelle vor dem Apoptosesignal schützt und somit ihr Überleben fördert zu erklären ist. Diese unterschiedlichen, teils widersprüchlichen Studienergebnisse weisen auf verschiedene Funktionen der einzelnen TRAIL-Rezeptoren in verschiedenen Malignomen hin. Auch scheint nicht die Funktion des einzelnen Rezeptors entscheidend für die Apoptosesensitivität und damit die Prognose eines Malignoms zu sein, sondern vielmehr die Wechselwirkung der unterschiedlichen Rezeptoren durch ihr Expressionsprofil. Es ist daher entscheidend, vor der Erwägung einer TRAIL-basierten Therapie zunächst gründlich die Bedeutung des TRAIL-Systems

4 Diskussion

und seiner einzelnen Mitglieder in dem betreffenden Malignom zu untersuchen, um diese zielführend angreifen zu können.

Unsere Arbeit präsentiert in diesem Zusammenhang mit DcR1/TRAIL-R3 und insbesondere mit dem unabhängigen negativen Prognosefaktor DcR2/TRAIL-R4 mögliche prädiktive Biomarker im follikulären Schilddrüsenkarzinom, welche hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine TRAIL-basierte zielgerichtete und individualisierte Therapie von follikulären Schilddrüsenkarzinomen weiter evaluiert werden sollten.

4.1.2 TRAIL induziert Apoptose in FTC Zellen in vitro

Das TRAIL-System und seine Expression ist nicht nur als prognostischer Marker interessant, sondern auch und vor allem als mögliche therapeutische Zielstruktur in bisher nicht adäquat therapierbaren Malignomen, wie dem metastasierten Radiojod-refraktären follikulären Schilddrüsenkarzinom. Präklinische Studien zeigten, dass viele Tumorzellen trotz hoher Todesrezeptorexpression resistent gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose sind oder werden [77, 92, 187, 188]. Es galt daher, im Anschluss an die Evaluation der TRAIL-Rezeptoren in Hinblick auf prognostische Wertigkeit, die Wirkung von TRAIL auf Zellen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms in Zellkulturversuchen zu analysieren.

Untersucht wurde dazu die Zelllinie TT2609-C02 [171]. Sie entstammt dem follikulären Schilddrüsenkarzinom eines 57-jährigen männlichen Kaukasiers mit Fernmetastasierung und im Verlauf entstandener Radiojod-Resistenz. Sie repräsentiert damit genau das von uns adressierten Patientenkollektiv mit schlechter Prognose und limitierten Therapieoptionen. In dieser Arbeit konnte die Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose nachgewiesen werden. Die konzentrationsabhängige Viabilitätsabnahme, welche im MTS-Assay detektiert wurde, konnte durch die FACS-Analyse mit FITC Annexin- und Propidiumiodid-Färbung validiert werden. Somit kann von einer TRAIL-vermittelten Apoptose-Induktion in der Zelllinie TT2609-C02 ausgegangen werden. Auch Mitsiades *et al.* zeigten, dass Zellen aus Karzinomen mit Ursprung im Follikelepithel der Schilddrüse im Gegensatz zu nicht-transformierten Thyreozyten sensibel für die TRAIL-vermittelte Caspasen-abhängige Apoptose waren [189].

4 Diskussion

Das in dieser Arbeit zur Apoptose-Induktion verwendete rekombinante humane TRAIL kann an alle humanen TRAIL-Rezeptoren binden. Studien zeigten aber, dass in einigen Tumorzelllinien überwiegend DR4/TRAIL-R1 für die Apoptose-Induktion verantwortlich ist, während in anderen Zelllinien der programmierte Zelltod über DR5/TRAIL-R2 ausgelöst wird. Von Interesse wären daher weitere Experimente zur Evaluation der für die TRAIL-Signaltransduktion verantwortlichen Rezeptoren im follikulären Schilddrüsenkarzinom, zum Beispiel durch Verwendung Rezeptor-spezifischer TRAIL Proteine.

Mitsiades *et al.* untersuchten auch die Expression der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 sowie der *decoy*-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 in verschiedenen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien. Sie konnten eine überwiegend starke Proteinexpression der Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 sowohl in Schilddrüsenkarzinomgewebe als auch in Zelllinien verschiedener Schilddrüsenkarzinome nachweisen. Auch die antiapoptotischen Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 konnten in Schilddrüsenkarzinomzellen nachgewiesen werden [181]. Dieses in der Literatur beschriebene Expressionsmuster des TRAIL-Systems bestätigte sich in dieser Arbeit weitestgehend für die Zelllinie TT2609-C02. So konnte im Western Blot eine starke Expression der Todesrezeptoren, vor allem von DR5/TRAIL-R2 gezeigt werden. Die *decoy*-Rezeptoren, vor allem DcR2/TRAIL-R4 waren schwächer exprimiert. Lediglich das TRAIL-Protein konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden.

Das Protein-Expressionsmuster korreliert nur teilweise mit der ebenfalls untersuchten RNA-Expressionsstärke der TRAIL-Mitglieder. Passend zu den Western Blot Ergebnissen konnte auf RNA-Ebene eine starke Expression der Todesrezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 (TRICK2A und TRICK2B) sowie eine schwache Expression der *decoy*-Rezeptoren gemessen werden. Allerdings stellten wir in der *real time* PCR eine starke Expression der TRAIL-Spleißvariante TRAIL- α fest, welche nicht mit der TRAIL-Protein-Expression im Western Blot korreliert. Die Gründe für Abweichungen zwischen RNA- und Proteinexpressionen können beispielsweise in verschiedenen post-transkriptionellen Prozessen und Modifikationen wie Glykosylierung, Membrantransport und Endozytose [79, 87, 88] oder Eigenschaften des verwendeten Antikörpers, wie Affinität und Spezifität liegen.

4 Diskussion

Neben der Expressionsstärke der Todesrezeptoren besteht eine weitere Möglichkeit der Regulierung der TRAIL-vermittelten Apoptose zu Beginn der Signalkaskade in Mutationen der Rezeptoren, welche zu Funktionsverlusten und damit zu fehlerhafter Transduktion des Signals führen können. Erste Hinweise auf zum Verlust der apoptotischen Funktion führende Mutationen der Todesrezeptoren lieferten Pai *et al.* und Ozoren *et al.* [83, 84]. Basierend auf einer Literaturrecherche wurden für diese Arbeit zur Sequenzierung die Exons 1 bis 5 der extrazellulären Domäne der Rezeptoren DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-R2 sowie das Exon 10, welches die intrazelluläre Todesdomäne repräsentiert ausgewählt [190, 191]. Diese Proteinabschnitte erfüllen elementare Aufgaben in der Signaltransduktion. Die extrazelluläre Domäne ist verantwortlich für die Ligandenbindung, die Todesdomäne für die Rekrutierung und Ausbildung des DISC zur Caspasen-Aktivierung. Daher können Mutationen in diesen Genabschnitten die Wirkung von TRAIL empfindlich beeinflussen. In der Zelllinie TT2609-C02 konnten wir im Rezeptor DR4/TRAIL-R1 in der extrazellulären Domäne *missense* Mutationen detektieren, welche einen Aminosäureaustausch zur Folge haben und somit potenziell die Konfiguration des Rezeptors verändern können. Im Rezeptor DR5/TRAIL-R2 wurden keine Veränderungen identifiziert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen frühere Arbeiten, welche die TRAIL-Rezeptoren auf Mutationen untersuchten [190, 192]. Die von uns identifizierten Mutationen betrafen das Exon 3 (G422A), das Exon 4 (C626G) sowie das Exon 5 (A683C). Diese Mutationen wurden ebenfalls in einer Reihe von Studien in verschiedenen Malignomen wie Lungenkrebs, Brustkrebs, Leberkrebs, Darmkrebs und hämatologischen Neoplasien beschrieben, mit sehr unterschiedlichen Aussagen bezüglich der prognostischen Relevanz für das Krebsrisiko. Die Ergebnisse von 16 relevanten klinischen Studien fassten Lu *et al.* 2014 in einer Metaanalyse zusammen [85]. Diese kam zu dem Ergebnis, dass der homozygote Genotyp der C626G Mutation eine Assoziation mit erhöhtem Krebsrisiko aufweist. Kein Zusammenhang mit erhöhtem Krebsrisiko stellen Lu *et al.* für die Mutationen A683C und G422A fest. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Erkenntnissen einer früheren Metaanalyse von Chen *et al.* aus dem Jahr 2009. Er beschrieb eine Assoziation von A683C, nicht aber von C626G mit erhöhtem Krebsrisiko. Seine Metaanalyse schloss allerdings nur Ergebnisse von 9 Studien bis 2009 ein [86]. Sowohl Lu *et al.* als auch Chen *et al.* berichten eine Assoziation mit erhöhtem Krebsrisiko für eine weitere Mutation A1322G, welche im Exon 10 liegt und damit in dem Bereich, der für die intrazelluläre Todesdomäne kodiert. Diese Mutation konnten wir in der Zelllinie

4 Diskussion

TT2609-C02 nicht nachweisen. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Punktmutationen der Todesrezeptoren mit Aminosäureaustausch einen Einfluss auf die Funktion der Rezeptoren und damit auf die Transduktion des Apoptosesignals haben können, dass dieser Einfluss aber in verschiedenen Tumoren sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Bisher gibt es noch keine Arbeit, die anhand von Patientenproben den Einfluss von Todesrezeptor-Mutationen auf die Prognose von Schilddrüsenkarzinomen untersucht hat.

Insgesamt weisen unsere Ergebnisse der Zellkulturversuche darauf hin, dass die TRAIL-vermittelte Apoptose in der von uns untersuchten Zelllinie induzierbar ist und nicht durch Rezeptor-assoziierte Faktoren inhibiert wird. Entsprechend geeignet ist das Modell zur Untersuchung anderer, sich anschließender Mitglieder der Signalkaskade, um Strukturen zu ermitteln, welche die Tumorzellen vor der Apoptose schützen und diese zum Beispiel durch Kombinationstherapien gezielt auszuschalten.

4.2 Die Rolle der IAPs im follikulären Schilddrüsenkarzinom

Die *inhibitor-of-apoptosis protein* (IAP) Familie ist eine Gruppe von Proteinen hoher Homologie mit wichtigen Funktionen in der Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose. Über Bindung und Inaktivierung von Caspasen können sie die nachgeschaltete Umsetzung des Apoptosesignals hemmen und so die Zelle vor dem Zelltod schützen [101, 113]. Einige von ihnen, darunter XIAP, cIAP1 und cIAP2 werden in nahezu allen humanen Geweben exprimiert, zeigen jedoch in vielen entarteten Zellen eine erhöhte Expression [111, 112]. Survivin dagegen wird fast ausschließlich in Malignomen exprimiert [106, 121]. Auch in der von uns untersuchten Zelllinie TT2609-C02 konnte in Western Blot Analysen eine starke Expression der Proteine XIAP, cIAP1, cIAP2 und vor allem Survivin demonstriert werden. Studien weisen auf eine bedeutende Funktion der IAPs in der Karzinogenese hin. XIAP wurde als unabhängiger ungünstiger Parameter für die Prognose des klarzelliges Nierenzellkarzinoms identifiziert [193]. Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zeigte sich eine Korrelation hoher XIAP-Expression mit ungünstigen Prognosekriterien [112]. Auch für die Prognose von Schilddrüsenkarzinomen scheinen die IAPs bedeutsam zu sein. Sowohl XIAP als auch Survivin konnten kürzlich als unabhängige Prognosemarker im follikulären und medullären Schilddrüsenkarzinom identifiziert werden [130, 194]. Passend dazu konnten Arbeiten zum papillären Schilddrüsenkarzinom eine signifikante Assoziation von XIAP mit ungünstiger

4 Diskussion

Prognose demonstrieren [195]. Diese Ergebnisse legen den Gedanken nahe, dass der inhibitorische Effekt der IAPs auf die Apoptose einen zentralen Schutzmechanismus von Tumorzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose darstellt und somit ein interessantes Ziel für TRAIL-basierte Kombinationstherapien abbildet.

In dieser Arbeit wurde dazu die Wirkung IAP-inhibitorischer Substanzen in der Kombination mit TRAIL auf die Zelllinie TT2609-C02 untersucht. Ein idealer Kandidat zur gezielten Ausschaltung der IAPs ist aufgrund seiner einzigartigen zentralen Funktion in der Apoptose-Regulation das Protein Smac. Es bindet und inaktiviert IAPs und verhindert somit die nachgeschaltete Inaktivierung von Caspasen. Es stehen Substanzen zur Verfügung, welche als Smac-Mimetika wirken und so die Apoptose-Induktion durch Todesrezeptor-Liganden wie TRAIL unterstützen [139, 196]. Anhand der Ergebnisse einer Literaturrecherche wurden zwei Smac-mimetische Substanzen für unsere Versuche an Zellen des follikulären Schilddrüsenkarzinoms ausgewählt.

GDC-0152 entfaltet seine Wirkung hauptsächlich gegen XIAP, cIAP1, cIAP2 und ML-IAP. Eine Apoptose-induzierende Wirkung mit IAP-Degradation konnte in verschiedenen Tumorzelllinien sowie *in vivo* in xenotransplantierten Mäusen nachgewiesen werden [197-199].

Als zweite Substanz wählten wir Birinapant mit beschriebener Wirkung hauptsächlich gegen cIAP1 und XIAP. Zahlreiche präklinische Studien belegen eine Apoptose-fördernde Funktion durch Herunterregulierung von IAPs, beispielsweise in Kopf-Hals Tumoren, Brustkrebs und Akuter lymphatischer Leukämie [200-203]. Außerdem demonstrierten erste klinische Studien zu Chemotherapie-refraktären Ovarialkarzinomen sowie weiteren soliden Tumoren und Lymphomen eine IAP-Degradation *in vivo* bei relativ guter Verträglichkeit sowie teilweise, jedoch nicht statistisch eindeutige Hinweise auf Antitumor-Wirksamkeit von Birinapant [204, 205].

4.2.1 Smac-Mimetika sensitivieren FTC Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose durch Degradation von cIAP1 und cIAP2

Bei alleiniger Behandlung hatten sowohl GDC-0152 als auch Birinapant keine apoptotische Wirkung auf die FTC Zelllinie. Die Ergebnisse des MTS-Assays, welche gleichbleibende Zellviabilität auch bei Behandlung mit hohen Konzentrationen zeigten, wurden bestätigt durch die Durchführung von FACS-Analysen nach Behandlung mit den Smac-Mimetika. Auch hier konnte keine signifikante Steigerung der FITC

4 Diskussion

Annexin- und PI-positiven Zellen beobachtet werden. Dies erscheint auf den ersten Blick diskrepant zu den in der Literatur häufig publizierten Ergebnissen einer Apoptose-Induktion durch Smac-Mimetika [206-208]. Verschiedene Studien belegen jedoch, dass die Fähigkeit von IAP-Antagonisten, alleine Apoptose auszulösen abhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit von Todesrezeptor-Liganden wie TNF α ist [139, 196, 209, 210]. Tumorzellen, welche in diesen Arbeiten sensibel für IAP-Antagonisten alleine waren, sezernierten nachweislich autokrin TNF α , während primär resistente Zellen kein TNF α sezernierten, jedoch durch die Zugabe von TNF α sensibel wurden. Petersen *et al.* zeigten, dass die durch IAP-Antagonisten induzierte Apoptose Caspase-8-abhängig war, was dafürspricht, dass sie über Rezeptoren der TNF-R Familie vermittelt wurde. Außerdem können Zellen sekundär resistent gegenüber Smac-Mimetika werden, indem NF- κ B-vermittelt cIAP1 hochreguliert wird, welches dann der Smac-Wirkung entgegenarbeitet [133]. Welcher Resistenzmechanismus genau für die fehlende Apoptose-induzierende Wirkung von GDC-0152 und Birinapant in der FTC Zelllinie verantwortlich ist, ist nicht abschließend geklärt. Der in unserer Arbeit gezeigte fehlende Nachweis des TRAIL-Liganden in der Zelllinie TT2609-C02 im Western Blot legt eine fehlende autokrine TRAIL-/TNF α -Sekretion als Ursache für die Resistenz gegenüber GDC-0152 und Birinapant nahe, ist aber nicht beweisend.

Die daraufhin durchgeführte kombinierte Behandlung der Zelllinie TT2609-C02 mit TRAIL und einem IAP-Inhibitor bestätigten diese These. Beide Substanzen erhöhten, kombiniert mit TRAIL die Zahl nicht viabler bzw. apoptotischer Zellen signifikant gegenüber der alleinigen Behandlung mit TRAIL über das durch additive Effekte erwartete Maß hinaus. Somit konnten wir in eindeutiger Weise einen sensitivierenden Effekt der Smac-Mimetika GDC-0152 und Birinapant für die TRAIL-induzierte Apoptose in FTC Zellen demonstrieren. Nach unserem Wissen sind dies die ersten Daten zu TRAIL-Sensitivierungsversuchen am follikulären Schilddrüsenkarzinom.

Vielversprechende Daten zeigten bereits mehrere präklinische Studien zur Kombination von Smac-Mimetika und TRAIL in anderen Malignomen. Fakler *et al.* untersuchten die Kombination von XIAP-Inhibitoren und TRAIL in Zellen akuter lymphatischer Leukämien bei Kindern. Sie stellten eine signifikante Verstärkung TRAIL-induzierter Apoptose über erhöhte Spaltung von Caspasen fest und wiesen gleichzeitig nach, dass weder der XIAP-Inhibitor alleine, noch in Kombination mit TRAIL Apoptose in nicht-transformierten Leukozyten auslöst [211]. In Melanomzellen konnte eine synergistische

4 Diskussion

Wirkung von Smac-Mimetika in Kombination mit TRAIL und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib gezeigt werden [212] und auch Kolonkarzinomzellen konnten durch Smac-Mimetika erfolgreich für TRAIL-vermittelte Apoptose sensitiviert werden [213].

Western Blot Analysen nach Behandlung mit GDC-0152 oder Birinapant in steigender Konzentration demonstrierten eine Abnahme der Proteinexpression vor allem von cIAP1 und schwächer ausgeprägt auch von cIAP2 in TT2609-C02 Zellen. Dies bestätigt die in anderen Malignomen beschriebene IAP-Degradation auch in Zellen des follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Eine ebenfalls sehr häufig beschriebene Abnahme der Expression von XIAP konnte in unseren Versuchen nicht bestätigt werden. Es ergibt sich daraus die Annahme, dass die Sensitivierung der TT2609-C02 Zellen für TRAIL durch GDC-0152 und Birinapant vorrangig über eine Degradation der *inhibitor-of-apoptosis* Proteine cIAP1 und cIAP2 vermittelt wird.

Insgesamt passen unsere Ergebnisse zu der Annahme, dass Smac-Mimetika durch Inhibierung von IAPs synergistisch mit Todesrezeptor-Liganden wie TRAIL agieren, jedoch selbst kein eigenes apoptotisches Potential besitzen. Diese Eigenschaft kann zur gezielten Eliminierung von Tumorzellen genutzt werden.

4.3 Können TRAIL und IAP-Inhibitoren in der Zukunft Einzug in die Therapie des follikulären Schilddrüsenkarzinoms erhalten?

Die von uns präsentierten Ergebnisse weisen auf eine vielversprechende Wirkung der Kombination von TRAIL mit IAP-Antagonisten wie GDC-0152 oder Birinapant in der Therapie des follikulären Schilddrüsenkarzinoms hin. Außerdem beweisen die Ergebnisse der Immunhistochemie eine prognostische Relevanz des TRAIL-Systems im FTC. Diese Erkenntnisse therapeutisch zu nutzen könnte vor allem für Patienten in metastasiertem Stadium mit Radiojod-refraktären Karzinomen einen neuen Ansatz zu verbesserten Therapiemöglichkeiten darstellen. Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, untersuchen bereits zahlreiche klinische Studien die Wirksamkeit TRAIL-basierter Medikamente in verschiedenen Malignomen. Sowohl rekombinante TRAIL-Formen als auch agonistische Antikörper für DR4/TRAIL-R1 oder DR5/TRAIL-R2 werden in den letzten Jahren in einer Vielzahl verschiedener Malignome in Kombination mit konventioneller Chemotherapie evaluiert. Im Gegensatz zu den vielversprechenden präklinischen Ergebnissen konnte bisher trotz positiver Trends

4 Diskussion

keine dieser Studien signifikant verbesserte Ergebnisse der Kombinationstherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie zeigen. Während in den letzten Jahren vor allem die Toxizität einiger TRAIL-Agonisten problematisch war, zeichnet sich die neue Generation TRAs durch gute Verträglichkeit aus. Diese Weiterentwicklung sowie der Umstand eines immer weiterwachsenden Arsenal an chemischen Compounds, mit welchen gezielt wichtige Akteure der Zellregulation ausgeschaltet werden können, haben das Interesse an TRAIL-basierten Kombinationstherapien neu befeuert. Eine wichtige Substanzgruppe sind hier die Smac-mimetisch wirkenden IAP-Inhibitoren. Durch die Kombination zweier synergistisch wirkender Substanzen wie TRAIL und IAP-Inhibitoren können die Vorteile beider Medikamente genutzt und verstärkt werden, während die gleichzeitig mögliche Dosisreduktion die Nebenwirkungen reduziert.

Auch zu Smac-Mimetika wurden aufgrund ihres großen Potenzials zum therapeutischen Einsatz in der Krebstherapie erste klinische Studien zu Verträglichkeit und Wirksamkeit durchgeführt. Die Einnahme des IAP-Inhibitors LCL161 führte bei 53 Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren zur Degradation von cIAP1 in Tumorbiopsien der Patienten bei relativ guter Verträglichkeit. Einzige Dosis-limitierende Nebenwirkung war die Hochregulation inflammatorischer Zytokine in 6 % der Patienten [214]. In einer weiteren Phase-1 Studie an 50 Patienten mit soliden Tumoren oder Lymphomen bewirkte das Smac-Mimetikum Birinapant eine cIAP1 Degradation sowie in einigen Patienten Anzeichen für vorhandene Antitumor-Wirkung bei insgesamt guter Verträglichkeit [204]. Es gibt allerdings auch Hinweise auf unerwünschte Wirkungen von IAP-Inhibitoren. Eine präklinische Studie von Tchoghandjian *et al.* zeigte nach Behandlung mit dem Smac-Mimetikum BV6 eine Steigerung von Migration und Invasivität von Glioblastomzellen [215]. Eine Induktion von NF- κ B infolge der Degradation von cIAP1 und cIAP2 wird sowohl einerseits mit gesteigertem Zellüberleben, Zellmigration und Invasivität in Verbindung gebracht [133, 215, 216], als auch andererseits mit erhöhter Apoptose-Empfindlichkeit durch Hochregulierung der TNF α Sekretion [196, 209, 217].

Eine Voraussetzung für die Entwicklung von Kombinationstherapien sind immer detailliertere Kenntnisse der Apoptose-Signalwege sowie ihrer Regulation und möglicher antiapoptotischer Funktionen beteiligter Proteine. Ein Verständnis der Komplexität der zellulären Balance zwischen Apoptose und Überleben sowie möglicher unerwarteter Nebeneffekte durch Eingriffe in diese Balance sind unerlässlich. Auch

4 Diskussion

müssen zunächst Sicherheit und Wirksamkeit der Smac-Mimetika mithilfe von Mausmodellen sowie in weiteren klinischen Studien hinreichend gesichert werden, um ihren Weg in die Krebstherapie zu ermöglichen.

Von daher bieten unsere Daten einen neuen Ausgangspunkt zur Etablierung neuer Kombinationstherapien, welche jedoch einer weiteren Validierung in zukünftigen präklinischen und klinischen Studien bedürfen, um das große Potential TRAIL-basierter Therapieoptionen endlich zu nutzen.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend liefert diese Arbeit bedeutende Erkenntnisse über TRAIL als Therapieziel in follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Wichtig sind diese besonders in Hinblick auf Patienten mit Metastasierung und Radiojod-refraktären Karzinomen, welche derzeit mit äußerst limitierten Therapieoptionen und ausgesprochen schlechter Prognose konfrontiert sind. In dieser Arbeit konnte mit der Identifizierung der Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 als prognosebestimmende Faktoren der prognostische Wert des TRAIL-Systems im follikulären Schilddrüsenkarzinom demonstriert werden. Außerdem konnte die Sensitivität einer Zelllinie aus follikulärem Schilddrüsenkarzinom für TRAIL gezeigt, sowie die Empfindlichkeit der Zellen für TRAIL durch Kombination mit Smac-Mimetika via IAP-Degradation bedeutsam gesteigert werden. Auch wenn für auf die Allgemeinheit übertragbare Aussagen ein größeres Patientenkollektiv sowie zusätzliche Zelllinien untersucht werden müssen, präsentieren wir in der Kombination von TRAIL und Smac-Mimetika einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie des follikulären Schilddrüsenkarzinoms.

Voraussetzung für diesen Transfer ist jedoch eine weitere Erforschung der vielschichtigen Interaktionen von Smac-Mimetika und TRAIL mit pro- und antiapoptotischen Signalwegen. Auch müssen weitere klinische Studien Aufschluss über Sicherheit und Verträglichkeit der Smac-Mimetika geben. Untersuchungen der IAP-Expression in follikulären Schilddrüsentumoren könnten genauere Informationen über deren prognostische Relevanz geben und Patienten identifizieren, die besonders von einer Therapie mit TRAIL und IAP-Inhibitor profitieren könnten. Ein nächster interessanter Schritt der präklinischen Untersuchung könnte die Etablierung von

4 Diskussion

Mausmodellen mit xenotransplantierten follikulären Schilddrüsenkarzinomen und deren Behandlung mit TRAIL und GDC-0152 oder Birinapant sein.

Die Identifizierung der TRAIL-Rezeptoren DcR1/TRAIL-R3 und DcR2/TRAIL-R4 als prognostische Marker im follikulären Schilddrüsenkarzinom bietet interessante neue Forschungsansätze und sollte in größeren Patientenkollektiven validiert werden. Ihre Evaluation als prädiktive Biomarker für die Sensitivität gegenüber TRAs alleine oder in Kombination mit IAP-Inhibitoren könnte helfen, diejenigen Patienten zu identifizieren, die besonders von einer TRAIL-basierten Therapie profitieren würden. Außerdem sollte auch hier untersucht werden, inwieweit das Wissen um die prognostische Relevanz der *decoy*-Rezeptor-Expression therapeutisch genutzt werden könnte.

Die Kombination verschiedener Chemotherapeutika zur Sensitivierung ihrer Wirkungen, Minimierung von Nebenwirkungen sowie zur Entwicklung Patienten-individualisierter Schemata gewinnt mehr und mehr an Bedeutung in der Krebstherapie, sodass diese Arbeit mit ihren Ansätzen den Zeitgeist moderner Krebstherapie aufgreift.

VIII. Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013. **9. Ausgabe**.
2. N., H., et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014*. 2017 [cited 2017 July 24]; Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014.
3. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015. **10. Ausgabe**.
4. Schmid, K.W., *Pathogenese, Klassifikation und Histologie von Schilddrüsenkarzinomen*. Der Onkologe, 2010. **16(7)**: p. 644-656.
5. Xing, M., *Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13(3)**: p. 184-99.
6. Fukahori, M., et al., *The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort*. Thyroid, 2012. **22(7)**: p. 683-9.
7. Cardis, E., et al., *Risk of thyroid cancer after exposure to 131I in childhood*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97(10)**: p. 724-32.
8. Zimmermann, M.B. and V. Galetti, *Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies*. Thyroid Res, 2015. **8**: p. 8.
9. Nikiforov, Y.E., *Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets*. Mod Pathol, 2008: p. S37-43.
10. AWMF. *Operative Therapie maligner Schilddrüsenerkrankungen*. 2012; Available from: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/088-002.html>.
11. Mazurat, A., et al., *The age factor in survival of a population cohort of well-differentiated thyroid cancer*. Endocr Connect, 2013. **2(3)**: p. 154-60.
12. Spitzweg, C., et al., *[Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer]*. Dtsch Med Wochenschr, 2015. **140(3)**: p. 168-71.
13. Durante, C., et al., *Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91(8)**: p. 2892-9.
14. Schlumberger, M. and S. Leboulleux, *Treatment of distant metastases from follicular cell-derived thyroid cancer*. F1000Prime Rep, 2015. **7**: p. 22.
15. Vasko, V., et al., *Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88(6)**: p. 2745-52.
16. Medema, R.H. and J.L. Bos, *The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling*. Crit Rev Oncog, 1993. **4(6)**: p. 615-61.
17. Alonso-Gordoa, T., et al., *Advances in thyroid cancer treatment: latest evidence and clinical potential*. Ther Adv Med Oncol, 2015. **7(1)**: p. 22-38.
18. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23(5)**: p. 1011-27.

19. Schlumberger, M., et al., *Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(7): p. 621-30.
20. Brose, M.S., et al., *Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial*. Lancet, 2014. **384**(9940): p. 319-28.
21. Hoftijzer, H., et al., *Beneficial effects of sorafenib on tumor progression, but not on radioiodine uptake, in patients with differentiated thyroid carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(6): p. 923-31.
22. Cabanillas, M.E., et al., *A phase 2 trial of lenvatinib (E7080) in advanced, progressive, radioiodine-refractory, differentiated thyroid cancer: A clinical outcomes and biomarker assessment*. Cancer, 2015: p. 2749-56.
23. Locati, L.D., et al., *Treatment of advanced thyroid cancer with axitinib: Phase 2 study with pharmacokinetic/pharmacodynamic and quality-of-life assessments*. Cancer, 2014. **120**(17): p. 2694-703.
24. Bible, K.C., et al., *Efficacy of pazopanib in progressive, radioiodine-refractory, metastatic differentiated thyroid cancers: results of a phase 2 consortium study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(10): p. 962-72.
25. Leboulleux, S., et al., *Vandetanib in locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(9): p. 897-905.
26. Cabanillas, M.E., et al., *A phase I study of cabozantinib (XL184) in patients with differentiated thyroid cancer*. Thyroid, 2014. **24**(10): p. 1508-14.
27. Venkataraman, G.M., et al., *Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I-symporter gene methylation status*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(7): p. 2449-57.
28. Spitzweg, C., et al., *Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014. **2**(10): p. 830-42.
29. Ho, A.L., et al., *Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(7): p. 623-32.
30. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
31. Sun, Y. and Z.L. Peng, *Programmed cell death and cancer*. Postgrad Med J, 2009. **85**(1001): p. 134-40.
32. Hacker, G., *The morphology of apoptosis*. Cell Tissue Res, 2000. **301**(1): p. 5-17.
33. Bai, L. and S. Wang, *Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics*. Annu Rev Med, 2014. **65**: p. 139-55.
34. Medina, V., et al., *Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3697-707.

35. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
36. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
37. Brenner, D., H. Blaser, and T.W. Mak, *Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 362-74.
38. Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*. Blood, 2012. **119**(3): p. 651-65.
39. Adrain, C., et al., *Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE*. Science, 2012. **335**(6065): p. 225-8.
40. Chaudhary, P.M., et al., *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 821-30.
41. Zhang, X.D., et al., *Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma*. Cancer Res, 1999. **59**(11): p. 2747-53.
42. Fox, J.L. and M. MacFarlane, *Targeting cell death signalling in cancer: minimising 'Collateral damage'*. Br J Cancer, 2016. **115**(1): p. 5-11.
43. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4798-811.
44. Zhang, D.W., et al., *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science, 2009. **325**(5938): p. 332-6.
45. Silke, J., J.A. Rickard, and M. Gerlic, *The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation*. Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 689-97.
46. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 455-65.
47. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
48. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
49. Pan, G., et al., *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. Science, 1997. **276**(5309): p. 111-3.
50. Degli-Esposti, M.A., et al., *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1165-70.
51. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 813-20.
52. Marsters, S.A., et al., *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 1003-6.

53. Emery, J.G., et al., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14363-7.
54. Screaton, G.R., et al., *TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL*. Curr Biol, 1997. **7**(9): p. 693-6.
55. van Dijk, M., et al., *Resistance to TRAIL in non-transformed cells is due to multiple redundant pathways*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e702.
56. Pan, G., et al., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science, 1997. **277**(5327): p. 815-8.
57. Ganten, T.M., et al., *Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(10): p. 995-1007.
58. Granci, V., et al., *Prognostic significance of TRAIL-R1 and TRAIL-R3 expression in metastatic colorectal carcinomas*. Eur J Cancer, 2008. **44**(15): p. 2312-8.
59. Anees, M., et al., *The potential evasion of immune surveillance in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma by DcR2-mediated up-regulation of nuclear factor-kappaB*. Leuk Lymphoma, 2015. **56**(5): p. 1440-9.
60. Spierings, D.C., et al., *Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3397-405.
61. Cha, S.S., et al., *Expression, purification and crystallization of recombinant human TRAIL*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55**(Pt 5): p. 1101-4.
62. Cha, S.S., et al., *2.8 Å resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 253-61.
63. Krieg, A., et al., *TRAIL-beta and TRAIL-gamma: two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential*. Br J Cancer, 2003. **88**(6): p. 918-27.
64. Walczak, H., et al., *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL*. EMBO J, 1997. **16**(17): p. 5386-97.
65. Kischkel, F.C., et al., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 611-20.
66. Kantari, C. and H. Walczak, *Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(4): p. 558-63.
67. Amarante-Mendes, G.P. and T.S. Griffith, *Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond*. Pharmacol Ther, 2015: p. 117-31.
68. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
69. Cho, Y.S., et al., *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1112-23.
70. Cai, Z., et al., *Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 55-65.

71. Zhao, J., et al., *Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5322-7.
72. Dillon, C.P., et al., *Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex*. Cell Rep, 2012. **1**(5): p. 401-7.
73. Oberst, A., et al., *Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis*. Nature, 2011. **471**(7338): p. 363-7.
74. Dondelinger, Y., et al., *MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 971-81.
75. Wang, H., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3*. Mol Cell, 2014. **54**(1): p. 133-46.
76. Murphy, J.M., et al., *The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 443-53.
77. Koschny, R., H. Walczak, and T.M. Ganten, *The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(9): p. 923-35.
78. Horak, P., et al., *Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(6): p. 335-43.
79. Twomey, J.D., et al., *Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells*. Drug Resist Updat, 2015. **19**: p. 13-21.
80. Lee, M.W., et al., *RAD001 (everolimus) enhances TRAIL cytotoxicity in human leukemic Jurkat T cells by upregulating DR5*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **463**(4): p. 894-9.
81. Jung, Y.H., et al., *Tunicamycin sensitizes human prostate cells to TRAIL-induced apoptosis by upregulation of TRAIL receptors and downregulation of cIAP2*. Int J Oncol, 2012. **40**(6): p. 1941-8.
82. Ravi, R., et al., *Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 409-16.
83. Pai, S.I., et al., *Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3513-8.
84. Ozoren, N., et al., *Homozygous deletion of the death receptor DR4 gene in a nasopharyngeal cancer cell line is associated with TRAIL resistance*. Int J Oncol, 2000. **16**(5): p. 917-25.
85. Lu, J., et al., *Association of four polymorphisms in the death receptor 4 gene with cancer risk: an updated meta-analysis*. Tumour Biol, 2014. **35**(6): p. 5149-58.
86. Chen, B., et al., *TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis*. Eur J Cancer, 2009. **45**(14): p. 2598-605.
87. Wagner, K.W., et al., *Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1070-7.

88. Gry, M., et al., *Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 365.
89. Zhang, L., et al., *TRAIL activates JNK and NF-kappaB through RIP1-dependent and -independent pathways*. Cell Signal, 2015. **27**(2): p. 306-14.
90. Varfolomeev, E., et al., *Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40599-608.
91. Son, J.K., S. Varadarajan, and S.B. Bratton, *TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1*. Cell Death Differ, 2010. **17**(8): p. 1288-301.
92. Belyanskaya, L.L., et al., *TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8*. Lung Cancer, 2008. **60**(3): p. 355-65.
93. Jeon, Y.J., et al., *A set of NF-kappaB-regulated microRNAs induces acquired TRAIL resistance in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(26): p. E3355-64.
94. Zhang, L., et al., *RIP1 Cleavage in the Kinase Domain Regulates TRAIL-Induced NF-kappaB Activation and Lymphoma Survival*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(19): p. 3324-38.
95. Holen, I., et al., *Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1619-23.
96. Koksai, I.T., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma*. Urol Oncol, 2008. **26**(2): p. 158-65.
97. Lalaoui, N., et al., *TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19679.
98. Chamuleau, M.E., et al., *High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2*. Leuk Res, 2011. **35**(6): p. 741-9.
99. Merino, D., et al., *Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(19): p. 7046-55.
100. Morizot, A., et al., *Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 700-11.
101. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. EMBO J, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
102. Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
103. Duckett, C.S., et al., *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors*. EMBO J, 1996. **15**(11): p. 2685-94.

104. Liston, P., et al., *Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 349-53.
105. Rothe, M., et al., *The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1243-52.
106. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
107. Roy, N., et al., *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy*. Cell, 1995. **80**(1): p. 167-78.
108. Richter, B.W., et al., *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4292-301.
109. Hauser, H.P., et al., *A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors*. J Cell Biol, 1998. **141**(6): p. 1415-22.
110. Kasof, G.M. and B.C. Gomes, *Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3238-46.
111. Fong, W.G., et al., *Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines*. Genomics, 2000. **70**(1): p. 113-22.
112. Tamm, I., et al., *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1796-803.
113. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
114. Roy, N., et al., *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
115. Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 988-94.
116. Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, and R. Takahashi, *Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8662-7.
117. Yang, Y., et al., *Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli*. Science, 2000. **288**(5467): p. 874-7.
118. Huang, Y., et al., *Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain*. Cell, 2001. **104**(5): p. 781-90.
119. Shiozaki, E.N., et al., *Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 519-27.
120. Hunter, A.M., E.C. LaCasse, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets*. Apoptosis, 2007. **12**(9): p. 1543-68.
121. Altieri, D.C., *The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 609-15.

122. Lens, S.M., G. Vader, and R.H. Medema, *The case for Survivin as mitotic regulator*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(6): p. 616-22.
123. Kawasaki, H., et al., *Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(22): p. 5071-4.
124. Griffith, T.S., et al., *Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(11): p. 3093-9.
125. Shigeno, M., et al., *Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation*. *Oncogene*, 2003. **22**(11): p. 1653-62.
126. Hwang, J.S., et al., *Shogaol overcomes TRAIL resistance in colon cancer cells via inhibiting of survivin*. *Tumour Biol*, 2015: p. 8819-29.
127. Che, X., et al., *Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients*. *Urol Oncol*, 2012. **30**(4): p. 450-6.
128. Kempkensteffen, C., et al., *Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(5): p. 1081-6.
129. Tanimoto, T., et al., *Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *Cancer Lett*, 2005. **224**(1): p. 141-51.
130. Werner, T.A., et al., *Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma*. *Br J Cancer*, 2016. **114**(4): p. 427-34.
131. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. *Cell*, 2000. **102**(1): p. 33-42.
132. Yang, Q.H. and C. Du, *Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 16963-70.
133. Petersen, S.L., et al., *Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(26): p. 11936-41.
134. Thome, M., et al., *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors*. *Nature*, 1997. **386**(6624): p. 517-21.
135. Schneider, P., et al., *TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 831-6.
136. Budd, R.C., W.C. Yeh, and J. Tschopp, *cFLIP regulation of lymphocyte activation and development*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(3): p. 196-204.
137. Munshi, A., et al., *TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2*. *Oncogene*, 2001. **20**(29): p. 3757-65.
138. Indran, I.R., et al., *Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(6): p. 735-45.

139. Petersen, S.L., et al., *Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(5): p. 445-56.
140. Fulda, S., et al., *Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 808-15.
141. Guo, F., et al., *Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis*. *Blood*, 2002. **99**(9): p. 3419-26.
142. Ng, C.P. and B. Bonavida, *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl (Smac/DIABLO)*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(12): p. 1051-8.
143. Ashkenazi, A., et al., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(2): p. 155-62.
144. Lawrence, D., et al., *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 383-5.
145. Hylander, B.L., et al., *The anti-tumor effect of Apo2L/TRAIL on patient pancreatic adenocarcinomas grown as xenografts in SCID mice*. *J Transl Med*, 2005. **3**(1): p. 22.
146. Gazitt, Y., *TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells*. *Leukemia*, 1999. **13**(11): p. 1817-24.
147. Jin, H., et al., *Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival*. *Cancer Res*, 2004. **64**(14): p. 4900-5.
148. Daniel, D., et al., *Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts*. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 4037-46.
149. Walczak, H., et al., *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. *Nat Med*, 1999. **5**(2): p. 157-63.
150. Kelley, S.K., et al., *Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **299**(1): p. 31-8.
151. Lemke, J., et al., *TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5*. *J Mol Med (Berl)*, 2010. **88**(7): p. 729-40.
152. Kelley, R.F., et al., *Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 2205-12.

153. MacFarlane, M., et al., *Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1*. Cell Death Differ, 2005. **12**(7): p. 773-82.
154. Wainberg, Z.A., et al., *A phase IB study of dulanermin in combination with modified FOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2013. **12**(4): p. 248-54.
155. Herbst, R.S., et al., *Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(17): p. 2839-46.
156. Soria, J.C., et al., *Phase Ib study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(9): p. 1527-33.
157. Yee, L., et al., *A phase IB safety and pharmacokinetic (PK) study of recombinant human Apo2L/TRAIL in combination with rituximab in patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2007. **25**(18_suppl): p. 8078-.
158. Soria, J.C., et al., *Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(33): p. 4442-51.
159. Cheah, C.Y., et al., *Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma: an open-label phase 1b/2 randomised study*. Lancet Haematol, 2015. **2**(4): p. e166-74.
160. Trarbach, T., et al., *Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(3): p. 506-12.
161. Greco, F.A., et al., *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, 2008. **61**(1): p. 82-90.
162. Demetri, G.D., et al., *First-line treatment of metastatic or locally advanced unresectable soft tissue sarcomas with conatumumab in combination with doxorubicin or doxorubicin alone: a phase I/II open-label and double-blind study*. Eur J Cancer, 2012. **48**(4): p. 547-63.
163. Kindler, H.L., et al., *A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer*. Ann Oncol, 2012. **23**(11): p. 2834-42.
164. Paz-Ares, L., et al., *A randomized phase 2 study of paclitaxel and carboplatin with or without conatumumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(3): p. 329-37.
165. Cohn, A.L., et al., *A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant KRAS metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2013. **24**(7): p. 1777-85.

166. Fuchs, C.S., et al., *TRAIL receptor agonist conatumumab with modified FOLFOX6 plus bevacizumab for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A randomized phase 1b/2 trial*. *Cancer*, 2013. **119**(24): p. 4290-8.
167. Reck, M., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with chemotherapy-naïve metastatic/unresectable non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2013. **82**(3): p. 441-8.
168. Forero-Torres, A., et al., *Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer*. *Cancer Med*, 2013. **2**(6): p. 925-32.
169. Forero-Torres, A., et al., *TBCRC 019: A Phase II Trial of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel with or without the Anti-Death Receptor 5 Monoclonal Antibody Tigatuzumab in Patients with Triple-Negative Breast Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(12): p. 2722-9.
170. Cheng, A.L., et al., *Safety and efficacy of tigatuzumab plus sorafenib as first-line therapy in subjects with advanced hepatocellular carcinoma: A phase 2 randomized study*. *J Hepatol*, 2015. **63**(4): p. 896-904.
171. Geldof, A.A., et al., *Clonally related but phenotypically divergent human cancer cell lines derived from a single follicular thyroid cancer recurrence (TT2609)*. *Thyroid*, 2001. **11**(10): p. 909-17.
172. Leyden Webb, J., *General Principles of Inhibition*. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, 1963. **1**: p. 487-512.
173. Rothe, G., *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, 2007: p. 27–70.
174. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
175. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
176. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
177. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
178. McShane, L.M., et al., *REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK)*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(12): p. 1690-6.
179. Bretz, J.D., et al., *TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 23627-32.
180. Lemke, J., et al., *Getting TRAIL back on track for cancer therapy*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(9): p. 1350-64.

181. Mitsiades, N., et al., *Thyroid carcinoma cells are resistant to FAS-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4122-9.
182. Cooper, W.A., et al., *Role and prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor DR5 in nonsmall-cell lung cancer and precursor lesions*. *Cancer*, 2008. **113**(1): p. 135-42.
183. Clancy, L., et al., *Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(50): p. 18099-104.
184. Jin, Z., et al., *Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(34): p. 35829-39.
185. Kriegl, L., et al., *Microsatellite instability, KRAS mutations and cellular distribution of TRAIL-receptors in early stage colorectal cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51654.
186. Gallmeier, E., et al., *Loss of TRAIL-receptors is a recurrent feature in pancreatic cancer and determines the prognosis of patients with no nodal metastasis after surgery*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56760.
187. Zhang, L. and B. Fang, *Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2005. **12**(3): p. 228-37.
188. Eggert, A., et al., *Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1314-9.
189. Mitsiades, C.S., V. Poulaki, and N. Mitsiades, *The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer*. *J Endocrinol*, 2003. **178**(2): p. 205-16.
190. Dechant, M.J., et al., *Mutation analysis of the apoptotic "death-receptors" and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(5): p. 661-7.
191. Fisher, M.J., et al., *Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(6): p. 1688-97.
192. Fernandez, V., et al., *Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms*. *Haematologica*, 2004. **89**(11): p. 1322-31.
193. Ramp, U., et al., *XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas*. *Hum Pathol*, 2004. **35**(8): p. 1022-8.
194. Werner, T.A., et al., *Survivin and XIAP - two potential biological targets in follicular thyroid carcinoma*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 11383.
195. Hussain, A.R., et al., *Role of X-Linked Inhibitor of Apoptosis as a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Papillary Thyroid Carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(7): p. E974-85.

196. Varfolomeev, E., et al., *IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis*. Cell, 2007. **131**(4): p. 669-81.
197. Flygare, J.A., et al., *Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152)*. J Med Chem, 2012. **55**(9): p. 4101-13.
198. Hu, R., et al., *GDC-0152 induces apoptosis through down-regulation of IAPs in human leukemia cells and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway*. Tumour Biol, 2015. **36**(2): p. 577-84.
199. Tchoghandjian, A., et al., *Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152*. Cell Death Dis, 2016. **7**(8): p. e2325.
200. Allensworth, J.L., et al., *Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF-alpha-independent mechanism*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **137**(2): p. 359-71.
201. Eytan, D.F., et al., *SMAC mimetic birinapant plus radiation eradicates human head and neck cancers with genomic amplifications of cell death genes FADD and BIRC2*. Cancer Res, 2016: p. 5442-54.
202. Gerges, S., K. Rohde, and S. Fulda, *Cotreatment with Smac mimetics and demethylating agents induces both apoptotic and necroptotic cell death pathways in acute lymphoblastic leukemia cells*. Cancer Lett, 2016. **375**(1): p. 127-32.
203. Benetatos, C.A., et al., *Birinapant (TL32711), a bivalent SMAC mimetic, targets TRAF2-associated cIAPs, abrogates TNF-induced NF-kappaB activation, and is active in patient-derived xenograft models*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(4): p. 867-79.
204. Amaravadi, R.K., et al., *A Phase I Study of the SMAC-Mimetic Birinapant in Adults with Refractory Solid Tumors or Lymphoma*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(11): p. 2569-75.
205. Noonan, A.M., et al., *Pharmacodynamic markers and clinical results from the phase 2 study of the SMAC mimetic birinapant in women with relapsed platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian cancer*. Cancer, 2016. **122**(4): p. 588-97.
206. Opel, D., et al., *Targeting inhibitor of apoptosis proteins by Smac mimetic elicits cell death in poor prognostic subgroups of chronic lymphocytic leukemia*. Int J Cancer, 2015. **137**(12): p. 2959-70.
207. Condon, S.M., et al., *Birinapant, a smac-mimetic with improved tolerability for the treatment of solid tumors and hematological malignancies*. J Med Chem, 2014. **57**(9): p. 3666-77.
208. El-Mesery, M., M.E. Shaker, and A. Elgaml, *The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF-alpha and TRAIL-induced apoptosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(18): p. 2015-2022.
209. Vince, J.E., et al., *IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis*. Cell, 2007. **131**(4): p. 682-93.

-
210. Moon, J.H., et al., *A novel small-molecule IAP antagonist, AZD5582, draws Mcl-1 down-regulation for induction of apoptosis through targeting of cIAP1 and XIAP in human pancreatic cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(29): p. 26895-908.
 211. Fakler, M., et al., *Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance*. *Blood*, 2009. **113**(8): p. 1710-22.
 212. Lecis, D., et al., *Novel SMAC-mimetics synergistically stimulate melanoma cell death in combination with TRAIL and Bortezomib*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(12): p. 1707-16.
 213. Perimenis, P., et al., *IAP antagonists Birinapant and AT-406 efficiently synergise with either TRAIL, BRAF, or BCL-2 inhibitors to sensitise BRAFV600E colorectal tumour cells to apoptosis*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 624.
 214. Infante, J.R., et al., *Phase I dose-escalation study of LCL161, an oral inhibitor of apoptosis proteins inhibitor, in patients with advanced solid tumors*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(28): p. 3103-10.
 215. Tchoghandjian, A., et al., *Identification of non-canonical NF-kappaB signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e564.
 216. Tchoghandjian, A., et al., *Smac mimetic promotes glioblastoma cancer stem-like cell differentiation by activating NF-kappaB*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(5): p. 735-47.
 217. Wagner, L., et al., *Smac mimetic sensitizes glioblastoma cells to Temozolomide-induced apoptosis in a RIP1- and NF-kappaB-dependent manner*. *Oncogene*, 2013. **32**(8): p. 988-97.

Danksagung

Den Erfolg dieser Arbeit habe ich nicht alleine zu verantworten, vielmehr ist er ein Gemeinschaftswerk, dafür möchte ich Danke sagen.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Krieg für die Bereitstellung des Themas sowie die engagierte Unterstützung und Präsenz von Beginn an bis zur Korrektur der geschriebenen Arbeit. Sein fachlicher Rat sowie seine fordernde und fördernde Betreuung waren stets Motivation und antreibende Kraft.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Thomas Werner, insbesondere für sein jederzeit offenes Ohr für meine Fragen, seine Unterstützung bei der Versuchsdurchführung sowie seine ausdauernden und wertvollen Korrekturen meiner ersten Schreibversuche. Sein Engagement und seine positive Energie waren ansteckend. Ich wünschte, Du hättest bis zum Ende dabei sein können. Und ich wünschte, Du könntest die Früchte all Deiner Arbeit im Leben noch ernten.

Herrn Dr. Levent Dizdar und Frau Dr. Sabrina Mersch möchte ich für ihre geduldige Einführung in das Arbeiten im Labor und ihre zahlreichen methodischen Ratschläge sehr herzlich danken. Danke, dass ich auch die blödesten Fragen stellen durfte.

Auch allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des chirurgischen Forschungslabors danke ich für die jederzeit positive Stimmung und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die meinen Werdegang geprägt und meine Ausbildung ermöglicht haben. Ich bin unendlich dankbar für ihre stetige bedingungslose Unterstützung und liebevolle Begleitung auf meinem Weg. Es ist gut, Euch an meiner Seite zu wissen.

Julian danke ich von ganzem Herzen für seine Geduld und seine Ratschläge, seine Ermutigungen und seine Liebe, die mir Kraft und Sicherheit gegeben haben.