Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ. Prof. Dr. Irene Esposito

Die Rolle des antiapoptotischen Proteins ARC in einer embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinie

Dissertation

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

vorgelegt von
Viktoriya Anatolìïvna Zlachevska
2023

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Ich widme diese Arbeit all den Menschen, die den Kampf für demokratische Werte und die Freiheit der Ukraine aufgenommen haben.

Zusammenfassung

Als häufigster maligner Weichteiltumor bei Kindern spricht das Rhabdomyosarkom vor allem in fortgeschrittenen Stadien nur schlecht auf konventionelle Chemo- und Radiotherapie an. Die Entwicklung neuartiger zielgerichteter Tumortherapeutika ist daher essenziell für die Verbesserung der Prognose betroffener Patienten. In Zellen zahlreicher Tumorentitäten ist die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Molekülen zugunsten apoptosehemmender Signalwege nachweislich gestört. Auf diese Weise entkommen Tumorzellen dem natürlichen Zelltod, der Apoptose, und entwickeln Resistenzen gegenüber Krebsmedikamenten. Für einen wichtigen Vertreter der antiapoptotischen Proteine, ARC, wurde in Vorarbeiten eine deutliche Überexpression im embryonalen Rhabdomyosarkom entdeckt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von ARC bei der intrinsischen und extrinsischen Apoptose in der embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 untersucht, indem seine Expression dauerhaft herabgesetzt wurde. Anschließend wurden die TE-671-Zellen nach dem *Knock-down* von ARC mit ABT-263, einem Inhibitor der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, behandelt. ABT-263 konnte als ein Induktor von intrinsischer und in geringerem Maße extrinsischer Apoptose in TE-671-Zellen bestätigt werden. ARC war sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma der Rhabdomyosarkomzellen lokalisiert. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von ARC auf den intrinsischen Apoptosesignalweg im Rhabdomyosarkom. Die Resistenz der TE-671-Zellen gegenüber ABT-263 konnte nicht durch einen *Knock-down* von ARC überwunden werden. Dies könnte an der Überexpression des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 und seiner fehlenden Regulierung durch ARC in Rhabdomyosarkomzellen liegen. Interessanterweise hatte ARC einen fördernden Einfluss auf die Expression des proapoptotischen Gegenspielers von Mcl-1, das Protein Mcl-1 S. Ein *Knock-down* von ARC führte zu einer verminderten Expression von Mcl-1 S in Rhabdomyosarkomzellen.

Der extrinsische Apoptosesignalweg wurde mithilfe des rekombinanten Todesliganden Super*Killer*TRAIL induziert. Bei der extrinsischen Apoptose konnte ein Synergismus zwischen ARC und TRAIL im Rhabdomyosarkom beobachtet werden. Durch einen *Knock-down* von ARC konnte die TRAIL-Resistenz von TE-671-Zellen aufgehoben werden. Der Effekt von TRAIL auf die Rhabdomyosarkomzellen wurde dabei wahrscheinlich über den Todesrezeptor DR5 vermittelt. Der extrinsische Apoptosesignalweg könnte einen wichtigen Mechanismus für die überlebensfördernde Rolle von ARC im Rhabdomyosarkom darstellen.

Summary

Rhabdomyosarcoma is the most common type of soft tissue malignancy in children. Advanced cancer stages are poorly susceptible to conventional radio- and chemotherapy. To improve the prognosis of affected patients, it is crucial to develop targeted tumor therapies. It is known that the balance between pro- and antiapoptotic molecules in cells of numerous tumor entities is disturbed towards antiapoptotic signals. In this way, tumor cells can evade the natural cell death, apoptosis, and develop cancer drug resistances. In our previous work we found a great overexpression of an important member of antiapoptotic proteins in embryonal rhabdomyosarcoma - the protein ARC.

In this study we investigated the role of ARC in intrinsic and extrinsic apoptosis after downregulating its expression in the embryonal rhabdomyosarcoma cell line TE-671. After knockdown of ARC TE-671 cells were treated with ABT-263, an inhibitor of the antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w. ABT-263 induced intrinsic and to a small amount extrinsic apoptosis in TE-671 cells. ARC localized to the nucleus and cytoplasm of rhabdomyosarcoma cells. There was no significant impact of ARC on the intrinsic apoptosis pathway in rhabdomyosarcoma. ARC knockdown could not reduce the resistance of TE-671 cells towards ABT-263. A possible reason could be the overexpression of Mcl-1 and its lack of regulation by ARC in rhabdomyosarcoma. Interestingly, ARC had a stimulating effect on the expression of the protein Mcl-1 S, the proapoptotic counterpart of Mcl-1. Knockdown of ARC reduced the expression of Mcl-1 S in rhabdomyosarcoma.

Extrinsic apoptosis was induced by the recombinant death ligand SuperKillerTRAIL. A synergistic effect in rhabdomyosarcoma was observed between ARC and TRAIL in extrinsic apoptosis pathway. Knockdown of ARC decreased the resistance of TE-671 cells towards TRAIL. The effect of TRAIL in rhabdomyosarcoma cells was most likely mediated through the death receptor DR5. The extrinsic apoptosis pathway could be an important mechanism of the prosurvival role of ARC in rhabdomyosarcoma.

Abkürzungsverzeichnis

°C · Grad Celsius
α · Alpha
β · Beta
ɣ· Gamma
µg · Mikrogramm
µl · Mikroliter

A

A1 · Bcl-2-related protein A1
ABT-199 · Venetoclax
ABT-263 · Navitoclax
AIF · apoptosis inducing factor
AML · akute myeloische Leukämie
APAF1 · apoptotic protease-activating factor 1
APO-1 · apoptosis antigen 1
ARC · apoptosis repressor with caspase recruitment domain
ARC-KO · ARC-Knock-down
ARMS · alveoläres Rhabdomyosarkom

B

Bad · Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak · Bcl-2 antagonist/killer 1
Bax · Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 · B-cell lymphoma 2
Bcl-w · Bcl-2-like protein 2
Bcl-xL · Bcl-2-like protein 1, long isoform
BH · Bcl-2-Homologie
Bid · BH3-interacting domain death agonist
Bik · Bcl-2-interacting killer
Bim · Bcl-2-interacting mediator of cell death
BIR · baclovirus IAP repeat
BMF · Bcl-2-modifying factor
Bok · Bcl-2-related ovarian killer
BSA · Rinderserumalbumin

C

Ca^{2+} · Calcium
c-Akt · Serin-Threonin-Kinase 1
CARD · caspase recruitment domain
CD95 · cluster of differentiation 95
c-Flip · cellular CD95/Fas linked inhibitor protein
CHOP · C/EBP homologous protein
cIAP1 · cellular inhibitor of apoptosis protein 1
cIAP2 · cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CK2 · Caseinkinase II
cm · Zentimeter
CO_2 · Kohlenstoffdioxid
CWS · Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe

D

dADP · Desoxyadenosindiphosphat
DAPI · 4′,6-Diamidin-2-Phenylindol
dATP · Desoxyadenosintriphosphat
DD · death domain
DED · death effector domain
dest. · destilliert
DIABLO · direct IAP binding protein with low pI
DISC · death inducing signaling complex
DMEM · dulbecco's modified eagle medium
DMSO · Dimethylsulfoxid
DNA · Desoxyribonukleinsäure
DR · death receptor
DRP1 · dynamin related protein 1

E

EDTA · Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA · enzyme-linked immunosorbent assay
ER · endoplasmatisches Retikulum
ERK · extrazelluläre signalregulierte Kinase
ERMS · embryonales Rhabdomyosarkom

F

FACS · fluorescence activated cell sorting
FADD · Fas associated death domain protein
Fas · Fas Todesrezeptor
FasL · Fas Ligand
FCS · fetal calf serum
FMK · Fluoromethylketongruppe
FNCLCC · Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
FOXO1 · forkhead box O1
FOXO3a · forkhead box O3a
FSC · forward scatter

G

g · Gramm
GAPDH · Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP · green fluorescent protein
GTPase · Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Gy · Gray

H

h · Stunde
H_2O · Wasser
HCl · Chlorwasserstoff
HEPES · 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1α · hypoxia-inducible factor 1α
H-Ras · Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRE · hypoxia response element
HRK · Harakiri
HtrA2 · high-temperature requirement A2

I

I · Stromstärke
IAP · inhibitor of apoptosis
IC_{50} · mittlere inhibitorische Konzentration
IF · Immunfluoreszenz
IGF-1R · insulin-like growth factor 1 receptor

J

JNK · c Jun N terminale Kinase

K

kDa · Kilodalton

L

L · Liter
LAPF · lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology and FYVE domains
LMP · lysosomale Membranpermeabilisierung

M

M · Mol
mA · Milliampere
Mcl-1 · myeloid cell leukemia-1
Mcl-1 S · myeloid cell leukemia-1 short
MDM2 · mouse double minute 2
MEK · mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase
mg · Milligramm
Mg^{2+} · Magnesium
ml · Milliliter
mM · Millimol

MOMP · mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA · messenger ribonucleic acid
mTOR · mammalian target of rapamycin
MTT · 3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium
MyoD1 · myogenic differentiation 1

N

NaCl · Natriumchlorid
NF-κB · nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng · Nanogramm
NK-Zellen · natürliche Killerzellen
nm · Nanometer
Nol3 · nucleolar protein 3
Noxa · phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
N-Ras · neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog

P

p · *(probability)* Signifikanzwert
P/E-Domäne · prolin- und glutaminsäurereiche Proteinregion
p53 · tumor protein p53
PARP · Poly ADP-ribose Polymerase
PAS · periodic acid–Schiff
PAX3 · paired box 3
PAX7 · paired box 7
PBS · phosphate buffered saline
PTP · permeability transition pore
PUMA · p53 upregulated modulator of apoptosis

R

R · Widerstand
R^2 · Bestimmtheitsmaß
RD · Rhabdomyosarkomzelllinie
RMS · Rhabdomyosarkom
RIP · receptor interacting protein

S

SDS · Natriumdodecylsulfat
shRNA · small hairpin ribonucleic acid
skTRAIL · superkillerTRAIL
Smac · second mitochondria-derived activator of caspase
SSC · side scatter

T

TAT · trans activator of transcription
tBid · truncated Bid
TBS · tris-buffered saline
TE-671 · embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie
TEMED · Tetramethylethylendiamin
TM · transmembrane Region
TNF · Tumornekrosefaktor
TNFR1 · TNFα Rezeptor 1
TNM · Tumor, Nodus, Metastasen
TRADD · TNF receptor associated death domain protein
TRAF · TNF receptor associated factor
TRAIL · TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris · Trisaminomethan

U

U · Spannung
UICC · Union Internationale contre le Cancer

V

v · Volumen
V · Volt
VEGF · vascular endothelial growth factor

W

w · Gewicht

WB · Western Blot

WHO · Weltgesundheitsorganisation

X

XIAP · X-linked inhibitor of apoptosis

Z

Z-DEVD-FMK · Caspase-3 Inhibitor

Z-IETD-FMK · Caspase-8 Inhibitor

Z-LEHD-FMK · Caspase-9 Inhibitor

ZNS · Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I

Summary II

Abkürzungsverzeichnis III

Inhaltsverzeichnis VII

1 Einleitung 10

1.1 Die Entstehung von Tumoren 10

1.2 Das Rhabdomyosarkom 11

1.3 Die Apoptose 19

1.3.1 Signalwege der Apoptose 20

1.3.2 Die Bedeutung von Apoptose für die Therapie maligner Tumoren 27

1.4 Der Apoptoseinhibitor ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) 30

1.4.1 Die Rolle von ARC in nicht-tumorösem Gewebe und in Tumoren 32

1.5 Ziele der Arbeit 37

2 Material und Methoden 39

2.1 Materialien 39

2.1.1 Laborgeräte 39

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 40

2.1.3 Chemikalien 40

2.1.4 Lösungen und Puffer 42

2.1.5 Zellkultur 43

2.1.6 Molekularbiologische Kits und Proteingrößenstandard 44

2.1.7 Antikörper 44

2.1.8 Apoptosemodulierende Substanzen 45

2.1.9 Software und Server 47

2.2 Methoden 48

2.2.1 Zellbiologische Methoden 48

2.2.2 Molekularbiologische Methoden 53

3 Ergebnisse 61

3.1 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die Proliferationskinetik der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 61

3.1.1 Nachweis des ARC-Knock-downs 61

3.1.2 Zelluläre Lokalisation von ARC 62

3.1.3 Abhängigkeit der Proliferation der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 von ARC 64

3.2 Der Knock-down von ARC nimmt Einfluss auf die Expression eines proapoptotischen Mitglieds der Bcl-2-Familie in der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 66

3.2.1 Expression proapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder nach ARC-Knock-down 66

3.2.2 Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder nach ARC-Knock-down 68

3.3 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die Sensitivität der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 gegenüber dem selektiven Bcl-2-Inhibitor ABT-263 70

3.3.1 ABT-263 führt zur Spaltung von PARP 71

3.3.2 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die ABT-263-induzierte Aktivierung der Caspasen-9, -8 und -3 72

3.3.3 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität nach ABT-263-Exposition 80

3.4 Der Knock-down von ARC erhöht die Sensitivität der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 gegenüber dem Todesliganden TRAIL 82

3.4.1 Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 83

3.4.2 TRAIL führt zur Spaltung von PARP 84

3.4.3 Der Knock-down von ARC führt zum Zelltod nach TRAIL-Exposition 86

4 Diskussion 89

4.1 Die Inhibition von Bcl-2 durch ABT-263 induziert Apoptose in Rhabdomyosarkomzellen 89

4.2 Eine Überexpression von Mcl-1 als möglicher Grund für die ABT-263-Resistenz von Rhabdomyosarkomzellen 91

4.3 ARC reguliert den Mcl-1 S-Proteinspiegel in Rhabdomyosarkomzellen 93

4.4 Ein Knock-down von ARC hebt die ABT-263-Resistenz von Rhabdomyosarkomzellen nicht auf 95

4.5 Ein Knock-down von ARC hebt die TRAIL-Resistenz von Rhabdomyosarkomzellen auf……97

5 Literaturverzeichnis 100

6 Anhang..... 117

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung von Tumoren

Der Begriff Tumor wird im medizinischen Gebrauch mit einer Neoplasie gleichgesetzt und bezeichnet eine Raumforderung, die aus körpereigenen entarteten Zellen besteht. Der klinische Begriff „Krebs“ bezieht sich auf solch eine Neoplasie. Es wird davon ausgegangen, dass Krebs eine Veränderung der Erbinformation eines Individuums, des Genoms, ist, die sich auf zellulärer Ebene abspielt. Im Wesentlichen kommt es durch die Einwirkung von Karzinogenen zur Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen und folglich zur Entstehung einer maligne transformierten Zelle, die sich unkontrolliert vermehrt. Karzinogene sind meist exogene Noxen wie Chemikalien, ionisierende Strahlung und Mikroorganismen. Doch auch angeborene Defekte beispielsweise der DNA-Reparaturgene oder Chromosomenfehlverteilungen können potenziell zur Tumorentstehung prädisponieren. Tumoröse Gewebemassen werden entsprechend ihrer Dignität eingestuft. Dabei unterscheidet man zwischen benignen und malignen Tumoren. Benigne Tumoren sind in der Regel gut differenziert, d.h. sie ähneln zu einem großen Teil ihrem Ursprungsgewebe. Diese Tumoren wachsen überwiegend langsam und verdrängend, jedoch nicht aggressiv-zerstörend. Des Weiteren metastasieren benigne Tumoren im Gegensatz zu den malignen Tumoren per definitionem nicht. Letztere zeichnen sich hingegen besonders durch ihr invasives, aggressiv-zerstörendes Wachstum aus. Metastasen, die maligne Tumoren darüber hinaus streuen, werden als eine der Haupttodesursachen bei Krebspatienten angesehen (**BERGER** et al., 2014; **BÖCKER** et al., 2012; **PECORINO**, 2012).

Neben der beschriebenen Invasions- und Metastasierungskapazität erlangen Tumorzellen weitere physiologische Eigenschaften, die von Hanahan und Weinberg zusammenfassend als die „*hallmarks of cancer*“ definiert wurden (**HANAHAN UND WEINBERG**, 2000). Gemäß der Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung erwerben Tumorzellen im Zuge ihrer Entwicklung das Potenzial zur unbegrenzten Zellteilung, die Fähigkeit zum autonomen Tumorzellwachstum durch die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen sowie die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen und Todesstimuli. Dies geschieht zumeist durch Aktivierung der für das Zellwachstum zuständigen Protoonkogene oder durch Deaktivierung der proliferationshemmenden Tumorsuppressorgene. Um die wachsende Zellmasse mit genügend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, können Tumorzellen die Neubildung von Blutgefäßen, die Angiogenese, induzieren. Neben diesen sechs bereits etablierten Tumorcharakteristika

werden derzeit zwei weitere *„hallmarks“* diskutiert. Zum einen ist dies die Resistenz gegenüber der Tumorzellzerstörung durch das körpereigene Immunsystem. Zum anderen wird ein veränderter Energiemetabolismus, der die Umwandlung von Zucker bei Vorhandensein von Sauerstoff ermöglicht, aufgeführt. Eine entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung aller genannten Tumormerkmale bilden zudem die tumorunterstützende Entzündung sowie die Instabilität und die Mutationen im Genom von Krebszellen (**HANAHAN UND WEINBERG**, 2011).

Ferner orientiert sich die Einteilung von Tumoren an ihrer Abstammung von den drei embryonalen Keimblättern: Dem Ektoderm, dem Mesoderm und dem Entoderm. Hier werden die zwei größten Gruppen unterschieden: Die epithelialen und die mesenchymalen Tumoren. Die beiden Keimblätter des Ektoderms und des Entoderms bilden den Ausgangspunkt für die epithelialen Tumoren. Aus dem pluripotenten Gewebe des Mesoderms entstehen die mesenchymalen Tumoren (**BÜHLING** et al., 2008).

1.2 Das Rhabdomyosarkom

Das Rhabdomyosarkom ist ein maligner Tumor mesenchymalen Ursprungs mit Differenzierungsmerkmalen quergestreifter Muskulatur (**BÖCKER** et al., 2012; **RUBIN** et al., 2011). Es ist der häufigste maligne Weichteiltumor bei Kindern und Jugendlichen, wobei Jungen zu etwa 20% öfter betroffen sind als Mädchen. In den Jahren 1980 bis 2017 erkrankten in Deutschland 2089 Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren am Rhabdomyosarkom. Der Häufigkeitsgipfel liegt bei Kindern unter 5 Jahren, wobei die Altersverteilung je nach Subtyp (siehe Abb. 1) stark variiert. Rhabdomyosarkome sind sehr aggressiv und in hohem Maße therapieresistent. Ihre Prognose ist bei einer Langzeit-Überlebenswahrscheinlichkeit von 69% unterdurchschnittlich und hat sich in den letzten 35 Jahren kaum verbessert (**DEUTSCHES KINDERKREBSREGISTER**, 2019).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat vier verschiedene Subtypen des Rhabdomyosarkoms definiert: Das embryonale, das alveoläre, das pleomorphe und das Spindelzell-/sklerosierende Rhabdomyosarkom (**FLETCHER** et al., 2013). Die beiden vorherrschenden Subtypen sind das alveoläre (ARMS) und das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS), wobei letzteres am häufigsten vorkommt. Das ERMS betrifft überwiegend Kinder unter 10 Jahren und ist vor allem im Hals-Nasen-Ohren-Bereich und im Urogenitaltrakt vorzufinden. Es hat mit einer Überlebensrate von über 70% die beste Prognose unter allen Rhabdomyosarkomtypen. Das ERMS vom botryoiden Subtyp, das traubenartig in Hohlorgane wie Uterus, Vagina und Harnblase hineinwächst, hat mit einer 95%-igen 5-Jahres-Überlebensrate eine besonders gute Prognose (**SCHLAG**, 2011; **SUN** et al., 2015). Meist werden die Rhabdomyosarkompatienten durch eine verdrängende

Gewebsgeschwulst auffällig, die sowohl schmerzhaft als auch schmerzfrei sein kann. Je nach Lokalisation variieren die Symptome von unspezifischen Beschwerden bis hin zu Blutungen, Organobstruktionen und sogar Blindheit und Lähmungserscheinungen (**KLIEGMAN UND NELSON**, 2007).

Das histologische Bild des ERMS variiert sehr stark von rundlichen bis hin zu stern- oder spindelförmigen Zellen verschiedener Größen mit eosinophilem, PAS-positivem Zytoplasma, die in eine Matrix aus primitivem mesenchymalem Gewebe eingebettet sind (Abb. 1). Die Querstreifung lässt sich meist erst elektronenmikroskopisch oder gar nicht nachweisen. Neben dem morphologischen Bild der Rhabdomyoblasten lassen sich Rhabdomyosarkomzellen außerdem durch den immunhistochemischen Nachweis einer Desmin-, Myogenin- oder MyoD1-Expression identifizieren (**BÖCKER** et al., 2012; **RIEDE UND BIANCHI**, 2004). Eine einheitliche zytogenetische Veränderung konnte für das ERMS bisher nicht entdeckt werden. Als eines der Hauptmerkmale vieler ERMS gilt neben dem Verlust der genetischen Prägung und zahlreichen Chromosomenamplifikationen und -translokationen der Verlust eines der beiden Allele diverser Gene auf Chromosom 11p15.5. Dieser Verlust der Heterozygotie kann unter anderem zu diagnostischen Zwecken genutzt werden (**DAVICIONI** et al., 2009). Die häufigsten Metastasierungsorte sind die Lunge, die Lymphknoten, die Leber und das Gehirn (**FOLPE UND INWARDS**, 2010).

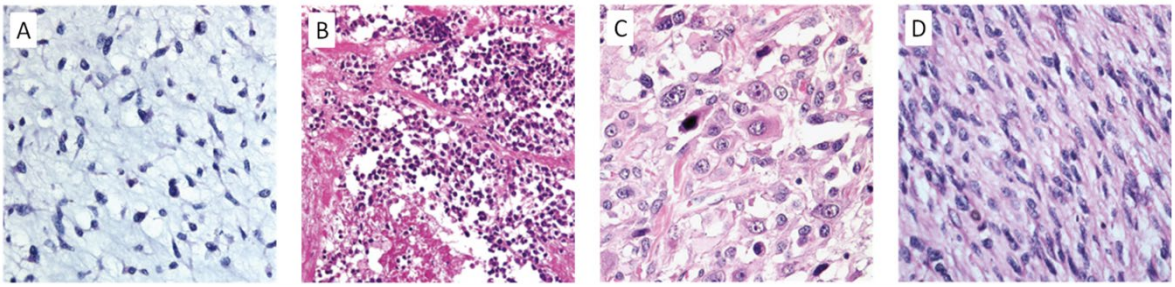


Abb. 1: Histologische Darstellung der Rhabdomyosarkomsubtypen. A: embryonales Rhabdomyosarkom; **B**: alveoläres Rhabdomyosarkom; **C**: pleomorphes Rhabdomyosarkom; **D**: Spindelzell-Rhabdomyosarkom. Quelle: **FOLPE UND INWARDS**, 2010. Alle Urheberrechte gewahrt.

Mit ca. 20% stellt das ARMS den zweithäufigsten Subtyp der Rhabdomyosarkomfamilie dar. Es betrifft vor allem Jugendliche und junge Erwachsene zwischen 10 und 25 Jahren und ist besonders im Bereich der Extremitäten und des Körperstamms vorzufinden (**BRENEMAN** et al., 2003). Die Prognose des ARMS ist deutlich schlechter als die des ERMS. Nach 5 Jahren sind nur noch 25 bis 30% der Patienten am Leben. Das ARMS wächst meist schnell und verdrängend, ohne jedoch Schmerzen zu verursachen, weswegen es meist erst spät entdeckt wird. Verglichen mit dem ERMS metastasiert das

ARMS bei ähnlichem Verteilungsmuster doppelt so häufig. Die meisten ARMS bestehen aus einheitlichen rundlichen Zellen, die nur selten eine Querstreifung aufweisen. Sie werden durch bindegewebige Septen zu Nestern mit zentralem Kohäsionsverlust geformt und erinnern somit an Alveolen der Lunge. Es existiert jedoch auch eine solide Variante des ARMS, die die alveoläre Zellarchitektur vermissen lässt. Eine kräftige diffuse Expression der muskulären Marker Desmin, Myogenin und MyoD1 ist meist auch bei der Diagnosestellung des ARMS hilfreich **(BÖCKER** et al., 2012; **FOLPE UND INWARDS**, 2010; **SCHLAG**, 2011). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal des ARMS vom ERMS ist das Vorhandensein von spezifischen chromosomalen Translokationen. In ca. 75% der Fälle kommt es zur Verschmelzung der für Transkriptionsfaktoren codierenden Gene PAX3 und FOXO1 durch die Translokation t(2;13)(q35;q14). Eine weitere, jedoch seltenere Translokation t(1;13)(p36;q14) erzeugt das Fusionsprodukt PAX7-FOXO1 (**DAVIS** et al., 1994; **GALILI** et al., 1993; **SUN** et al., 2015). Ein Nachweis der oben genannten Translokationen und der dazugehörigen Fusionsprodukte ist hoch spezifisch für das ARMS und konnte bisher nur dort nachgewiesen werden. PAX3 und PAX7 werden während der Embryonalentwicklung im Neuralrohr exprimiert und sind essenziell für die Wanderung von Myoblasten in die oberen und unteren Extremitäten. Die PAX7-FOXO1-positiven Tumoren unterscheiden sich klinisch stark von den PAX3-FOXO1-positiven Tumoren. Sie treten häufiger bei jungen Patienten auf, metastasieren seltener und zeigen eine deutlich bessere Gesamtüberlebensrate von 75% verglichen mit den 8% bei der PAX3-FOXO1-Variante. Somit bietet die Translokationsanalyse nicht nur eine wichtige diagnostische Stütze, sondern hat überdies einen hohen prognostischen Wert für das Überleben der Patienten (**SCHLAG**, 2011; **SKAPEK** et al., 2013).

Das pleomorphe Rhabdomyosarkom ist eine Rarität unter den Weichteilsarkomen. Es kommt überwiegend in den unteren Extremitäten erwachsener Männer vor und hat eine sehr schlechte Prognose. Die meisten Patienten versterben innerhalb eines Jahres nach Symptombeginn **(FOLPE UND INWARDS**, 2010).

Das letzte und jüngste Mitglied der Gruppe der Rhabdomyosarkome ist der Spindelzell-/sklerosierende Subtyp. Bei Kindern und Jugendlichen betrifft es die paratestikuläre Region und fällt besonders durch seine gute Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% auf (**CAVAZZANA** et al., 1992; **LEUSCHNER** et al., 1993). Bei Erwachsenen verhält sich diese Tumorentität ausgesprochen aggressiv, sie neigt zu einer hohen Metastasierungsrate und spricht nur sehr schlecht auf Chemotherapie an. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei gerade einmal 35%, wobei die Kopf-Hals-Region als Hauptprädilektionsort gilt (**NASCIMENTO UND FLETCHER**, 2005).

Um eine risikoadaptierte Therapie der Rhabdomyosarkome gewährleisten zu können, müssen neben den patientenbezogenen Daten vor allem die tumorbedingten Risikofaktoren genau erhoben werden. Als Grundlage zur Einteilung maligner

Weichteiltumoren gilt die TNM-Klassifikation der UICC (*Union Internationale contre le Cancer*). Diese wurde im Jahr 2017 für die Patientengruppe der Erwachsenen überarbeitet und anhand der befallenen Körperregion weiter differenziert. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, spielt dabei nicht nur die Größenausdehnung des Tumors eine Rolle, sondern auch der mögliche Befall regionaler und entfernter Lymphknoten sowie das potenzielle Vorhandensein von Fernmetastasen. Für das pädiatrische Patientenkollektiv sieht die aktuelle TNM-Klassifikation keine Differenzierung anhand der befallenen Körperregionen vor (Tabelle 2). Es werden jedoch günstige und ungünstige anatomische Lokalisationen unterschieden. Zu den günstigen anatomischen Lokalisationen zählen die Orbita, der Kopf- und Halsbereich sowie urogenitale Tumoren. Als ungünstige Lokalisationen gelten unter anderem die Blase, die Prostata, die Extremitäten, der Schädel, der Rumpf sowie das Retroperitoneum (**WITTEKIND**, 2017).

Der histopathologische Malignitätsgrad ist neben der TNM-Klassifikation ein entscheidender Punkt bei der Prognoseeinschätzung und Therapieplanung des Rhabdomyosarkoms. Das in Europa am häufigsten verwendete *Tumorgrading*-System für Weichteilsarkome wurde von der französischen Antitumorföderation FNCLCC (*La Fédération Nationale de Centres de Lutte Contre le Cancer*) etabliert. Bei diesem wird nach Auswertung der Tumordifferenzierung, der Anzahl möglicher Mitosen und der Anwesenheit von Nekrosen der Malignitätsgrad rechnerisch ermittelt und in einem dreistufigen *Grading*-System kategorisiert. Dabei beschreibt Grad 1 ein niedrigmalignes und die Grade 2 und 3 jeweils ein hochmalignes Geschehen (**COINDRE** et al., 1986).

T=Primärtumor			
	Extremitäten, Stammoberfläche und Retroperitoneum	Kopf-Hals-Region	Organe des Thorax und Abdomens
TX	Primärtumor nicht beurteilbar		
T0	kein Primärtumor nachweisbar		
T1	Tumor ≤ 5 cm	Tumor ≤ 2 cm	Tumor begrenzt auf ein Organ
T2a	Tumor > 5 ≤10 cm	Tumor > 2 ≤4 cm	Tumor infiltriert die Serosa des viszeralen Peritoneums
T2b			Tumor mit mikroskopischer Ausbreitung jenseits der Serosa
T3	Tumor > 10 ≤15 cm	Tumor > 4 cm	Infiltration eines zusätzlichen Organs oder makroskopische Ausbreitung jenseits der Serosa
T4a	Tumor > 15 cm	Infiltration der Orbita, Schädelbasis oder Dura, zentraler Organe, Gesichtsknochen oder Musculi pterygoidei	multifokaler Tumor mit Befall von mehr als zwei Regionen in einem Organ
T4b		Infiltration von Gehirn, prävertebraler Muskulatur, Umschließung der A. carotis oder Beteiligung des ZNS durch eine perineurale Ausbreitung	multifokaler Tumor mit Beteiligung von mehr als zwei, jedoch nicht mehr als fünf Regionen
T4c			multifokaler Tumor mit Beteiligung von mehr als fünf Regionen
N=Lymphknotenbefall			
NX	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar		
N0	regionäre Lymphknoten tumorfrei		
N1	regionärer Lymphknotenbefall		
M=Fernmetastasen			
M0	keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen (auch Befall kontralateraler oder entfernter Lymphknoten)		

Tabelle 1: **TNM-Klassifikation des Rhabdomyosarkoms bei Erwachsenen** (**WITTEKIND**, 2017).

T=Primärtumor	
T1	Tumor beschränkt auf einen anatomischen Bezirk
T1a	Tumor ≤ 5 cm
T1b	Tumor ≥ 5 cm
T2	Tumorausdehnung jenseits eines anatomischen Bezirks
T2a	Tumor ≤ 5 cm
T2b	Tumor ≥ 5 cm

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Rhabdomyosarkoms bei Kindern. Die Klassifikation des Lymphknoten- sowie Metastasenstatus ist analog der TNM-Klassifikation bei Erwachsenen (**WITTEKIND**, 2017).

Die Therapie des pädiatrischen Rhabdomyosarkoms erfolgt nach der Evaluierung aller patienten- und tumorbedingten Risikofaktoren nach einem multimodalen Konzept. Die Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) hat dazu fünf Patientengruppen definiert, die jeweils ein niedriges, mittleres, hohes oder ein sehr hohes Risiko in sich tragen, am Rhabdomyosarkom zu versterben. Die Patienten mit einem metastasierten Rhabdomyosarkom bildeten dabei eine eigene Risikogruppe (**COOPERATIVE WEICHTEILSARKOM STUDIENGRUPPE (CWS)**, 2012; **MEZA** et al., 2006). Tabelle 3 fasst die Therapie des kindlichen Rhabdomyosarkoms zusammen.

Risikogruppe	Subgruppe	Second-look-Chirurgie	Chemotherapie	Bestrahlung
niedrig	A	–	VA	–
mittel	B	–	IVA	–
	C	+		+ / –
	D	+		+
hoch	E, F, G	+	IVA	+
sehr hoch	H	+	IVA / IVAd	+
metastasiert		+	IVA / CEpV / IVE + O-TId / TE	+

Tabelle 3: **Therapieübersicht des pädiatrischen Rhabdomyosarkoms.** A: Actinomycin-D; Ad: Adriamycin; C: Carboplatin; E: Etoposid; Ep: Epirubicin; I: Ifosfamid; Id: Idarubicin; V: Vincristin; O-TId / TE: orale Erhaltungstherapie mit Trofosfamid und Idarubicin oder Etoposid. Eine primäre R0-Resektion des Tumorgewebes wird in allen Risikogruppen angestrebt. *Second-look*-Chirurgie: erneute operative

Sanierung nach bereits erfolgter Primärresektion. Quelle: (**COOPERATIVE WEICHTEILSARKOM STUDIENGRUPPE (CWS)** et al., 2012).

Das Therapiekonzept besteht aus zwei lokalen und einer systemischen Komponente. Den wichtigsten Pfeiler der lokalen Therapie bildet die chirurgische Resektion des Tumors mit möglichst tumorfreien Resektionsrändern. Die Patienten der Niedrigrisikogruppe erhalten nach der chirurgischen Tumorentfernung das Vincaalkaloid Vincistin und das zytostatisch wirksame Antibiotikum Actinomycin-D in vier Zyklen über 22 Wochen (**BEVERLY RANEY** et al., 2011). Diese systemische Therapiekomponente richtet sich gegen im Körper verbliebene Tumorzellen und ihre etwaigen Absiedlungen in anderen Organsystemen. Die Patienten, die der Standardrisikogruppe angehören, erhalten zusätzlich zu Vincristin und Actinomycin-D noch das Alkylanz Ifosfamid in insgesamt 9 Zyklen über 25 Wochen. In US-amerikanischen Studien wird der Einsatz von Cyclophosphamid anstelle von Ifosfamid praktiziert (**ARNDT** et al., 2009). Zusätzlich kann ab diesem Stadium lokal mit 36 bis 50,4 Gy bestrahlt werden. Die Strahlentherapie richtet sich wie die Chemotherapie gegen mikroskopische Tumorreste. Das Gesamtüberleben der beiden oben genannten Gruppen liegt bei jeweils 95%. Bei den Hochrisikogruppen E bis H gestaltet sich die Tumorresektion für gewöhnlich als sehr schwierig. Hier kann eine neoadjuvante Chemo- oder Radiotherapie zur Volumenverkleinerung vor der eigentlichen Operation erwogen werden. In der Patientengruppe mit einem sehr hohen Sterberisiko wird die Chemotherapie durch den Zusatz des Anthrazyklins Adriamycin zu den üblich verwendeten Therapeutika intensiviert. In bisherigen CWS-Studien konnte in den Gruppen mit hohem bzw. sehr hohem Sterberisiko ein Gesamtüberleben von 68% bzw. 29% erreicht werden. Gegenstand einer aktuellen Studie (CWS-2007-HR) ist der Nutzen einer sechsmonatigen oralen Erhaltungstherapie mit Trofosfamid und Idarubicin oder Etoposid bei Patienten der Hochrisikogruppe, welche sich in Remission befinden (**KLINGEBIEL** et al., 2008). In der Behandlung des metastasierten Rhabdomyosarkoms hat diese oral verabreichte Erhaltungstherapie bereits Einzug in die CWS-*Guidance* gehalten. Neben der Lokaltherapie erhalten die Patienten außerdem eine Kombination aus den Substanzen Ifosfamid, Vincristin, Actinomycin-D, Carboplatin, Epirubicin und Etoposid. Im Falle eines unzureichenden Therapieansprechens oder eines Krankheitsrückfalls werden Adriamycin, Cyclophophamid, Carboplatin, Topotecan, Trofosfamid, Idarubicin, Ifosfamid, Vincristin und Etoposid in unterschiedlichen Kombinationen als *second-line*-Therapie eingesetzt (**COOPERATIVE WEICHTEILSARKOM STUDIENGRUPPE (CWS)**, 2012). Für den Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan konnte in Phase-II-Studien ebenfalls eine gute Wirksamkeit in höheren Stadien des Rhabdomyosarkoms in Kombination mit Vincristin nachgewiesen werden (**MASCARENHAS** et al., 2010). Weitere vielversprechende klinische

Ansätze bieten die regionale Hyperthermie und die isolierte Extremitätenperfusion (**ISSELS** et al., 2010). Für Patienten mit metastasiertem Rhabdomyosarkom oder einem Rezidiv kann außerdem eine haploidentische Stammzelltransplantation von einem der Elternteile erwogen werden. Hierbei wird auf einen *allograft-vs-tumor* Effekt der elterlichen NK-Zellen gegen die Rhabdomyosarkomzellen gesetzt (**LANG** et al., 2006; **PÉREZ-MARTÍNEZ** et al., 2012). Trotz des multimodalen Therapiekonzepts bleibt die Prognose der Patienten mit fortgeschrittenem Rhabdomyosarkom schlecht. Dies unterstreicht das Erfordernis neuer Therapieansätze, um das Patientenüberleben zu verbessern.

Gegenstand der modernen Antitumorforschung sind unter anderem molekulare Zielproteine, die an Signalwegen des Zelltodes oder der Zellvermehrung maligne entarteter Zellen beteiligt sind. Sie versprechen eine zielgerichtete spezifische Therapie, die sich vor allem gegen Tumorzellen richtet und somit weniger Nebenwirkungen an gesundem Gewebe nach sich zieht. Solche molekularen *targets* sind beim Rhabdomyosarkom z.B. das *mammalian target of rapamycin* (mTOR), eine Proteinkinase, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielt (**HOUGHTON** et al., 2010). Als potenzielles Therapieziel dient auch der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der für die Tumorangiogenese unentbehrlich ist. In einer Phase-II-Studie konnte der Zusatz des mTOR-Inhibitors Temsirolimus zu den üblichen Chemotherapeutika einen Überlebensvorteil bei Patienten mit rezidiviertem Rhabdomyosarkom im Vergleich zum anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab bringen (**MASCARENHAS** et al., 2019). Ein weiteres vielversprechendes Zielprotein ist der *insulin-like growth factor* 1 Rezeptor (IGF-1R). IGF-1R ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die das Zellwachstum fördert und die Apoptose, den programmierten Zelltod, hemmt. Im Rahmen der ARST08P1-Studie konnte allerdings kein positiver Effekt des IGF-1R-spezifischen Antikörpers Cituxumumab auf das Überleben von Patienten mit metastasiertem Rhabdomyosarkom gezeigt werden (**MALEMPATI** et al., 2019; **WAGNER** et al., 2007).

Zahlreiche konventionelle Chemotherapeutika, die beim Rhabdomyosarkom eingesetzt werden, haben zum Ziel, Signalwege des Zelltodes in Tumorzellen zu induzieren **(MAKIN UND DIVE**, 2001). Der am besten untersuchte Signalweg ist der programmierte Zelltod, die Apoptose (**KERR** et al., 1972). In Krebszellen von Rhabdomyosarkompatienten konnten Veränderungen des Apoptosesignalwegs nachgewiesen werden, welche zu ihrer verminderten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika führen. Als einer der Hauptresistenzmechanismen gilt die erhöhte Expression von antiapoptotischen Proteinen durch Rhabdomyosarkomzellen (**ARMISTEAD** et al., 2007; **FULDA**, 2008; **PAZZAGLIA** et al., 2009). In *in-vitro*-Studien mit Rhabdomyosarkomzellen konnte die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika durch die Blockade der antiapoptotischen Proteine bereits erfolgreich überwunden werden (**FAQAR-UZ-ZAMAN** et al., 2018; **PREUSS** et al., 2013). Klinische Studien fehlen allerdings bis dato. Somit stellen Proteine des Apoptosesignalwegs

vielversprechende molekulare *targets* bei der spezifischen Therapie des Rhabdomyosarkoms dar (**VAN ERP** et al., 2018).

1.3 Die Apoptose

Die Apoptose (griech.: das Abfallen) beschreibt einen aktiven Prozess des „programmierten Zelltodes“, bei dem überschüssige, veraltete und geschädigte Zellen vom Körper abgebaut werden (**KERR** et al., 1972). Während physiologischer Prozesse wie der Embryonalentwicklung oder der Rückbildung von Organen dient das evolutionär hochkonservierte Prinzip der Apoptose der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Zellvermehrung und Zelltod. Doch auch bei pathologischen Ereignissen spielt die Apoptose eine große Rolle. Sie ist essenziell für die Elimination von geschädigten Körperzellen im Rahmen von ischämischen und degenerativen Vorgängen sowie für das Abtöten von mikrobiell infizierten und maligne entarteten Zellen (**GANTEN** et al., 2008).
Kerr und Kollegen beschreiben mehrere morphologische Veränderungen, die eine apoptotische Zelle während ihres „Suizids“ durchläuft. Zunächst löst sich die apoptotische Zelle aus ihrem Zellverband und schrumpft. Das Chromatin wird kondensiert und der Zellkern wird in kleine Teile fragmentiert. Bei einer Zerstörung des Zytoskeletts bildet die Zellmembran zahlreiche vesikuläre Ausstülpungen aus, die nachfolgend abgeschnürt werden. Diese abgeschnürten Membranvesikel werden als apoptotische Körperchen bezeichnet und enthalten das gesamte intrazelluläre Material (**KERR** et al., 1972; **KERR**, 1971; **WYLLIE** et al., 1980). Durch eine Verlagerung von Phosphatidylserinresten auf die Außenseite der Zellmembran werden die apoptotischen Körperchen und Zellen als „todgeweiht“ markiert und von Phagozyten erkannt und abgebaut (**FADOK** et al., 1992). Die Zellmembran sowie die Zellorganellen bleiben bis zu ihrer Phagozytose weitgehend intakt. Eine Entzündungsreaktion in der Umgebung der untergehenden Zelle, die durch das Platzen der Zellmembran induziert werden könnte, wird somit verhindert (**KERR** et al., 1972).
Die oben genannten Veränderungen werden durch die kaskadenartige Aktivierung von spezifischen Cysteinylaspartasen, kurz Caspasen, ausgelöst (**ALNEMRI** et al., 1996). In ihrem aktiven Zentrum enthalten die Caspasen die Aminosäure Cystein und spalten ihre Substratproteine vor der Aminosäure Aspartat, wovon sich ihr Name ableiten lässt. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose und werden je nach ihrer Funktion in Initiator- und Effektorcaspasen eingeteilt. Alle Caspasen werden als inaktive Zymogene, sog. Procaspasen, synthetisiert und müssen durch Spaltung oder Dimerisierung aktiviert werden. Nach ihrer kaskadenartigen Aktivierung zerstören die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) die Zelle von innen und erleichtern somit ihre

Phagozytose (**RIEDL UND SHI**, 2004). Sie spalten hochselektiv wichtige Bausteine des Zytoskeletts und des Zellkerns, DNA-Reparaturenzyme sowie zahlreiche Regulationsproteine des Zellwachstums (**LAZEBNIK** et al., 1994; **EARNSHAW** et al., 1999). Infolge der Aktivierung von Caspase-3 wird ferner die zelleigene DNA in Fragmente definierter Länge zerlegt (**LIU** et al., 1997).
Die Apoptose kann in drei aufeinander folgende Phasen unterschieden werden: Die Induktions-, die Effektor- und die Degradationsphase, in der die oben genannten Prozesse stattfinden. Dabei können zahlreiche interne und externe Signale das apoptotische Programm initiieren (**COHEN**, 1997).

1.3.1 Signalwege der Apoptose

Der extrinsische Signalweg

Im Rahmen des extrinsischen Apoptosesignalwegs verarbeitet die Zelle diejenigen Todessignale, die sie von außen aus ihrer Umgebung erreichen. Dazu verfügt sie in der Plasmamembran über sog. Todesrezeptoren mit cysteinreichen extrazellulären Domänen, welche die Bindung von Todesliganden ermöglichen. In der Literatur sind verschiedene Todesrezeptoren beschrieben, welche alle der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie angehören. Hierzu gehören vor allem der TNFα-Rezeptor 1 (TNFR1), CD95 (APO-1 *apoptosis antigen 1*/Fas), die TNF-*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren DR4 und DR5 sowie die *death*-Rezeptoren DR3 und DR6. Die Todesrezeptoren binden ihre entsprechenden Liganden an der Zelloberfläche und leiten das Todessignal ins Zellinnere weiter (**LAVRIK** et al., 2005; **SCHULZE-OSTHOFF** et al., 1998). Wie in Abb. 2 gezeigt, führt die Bindung des Liganden zu einer Trimerisierung der Todesrezeptoren und einer Exposition ihrer zytoplasmatischen *death domain* (DD), einer definierten C-terminalen Aminosäuresequenz. Die intrazellulären Adapterproteine FADD (*Fas-associated death domain protein*) und TRADD (*TNF receptor-associated death domain protein*) verfügen ebenfalls über eine Todesdomäne (DD), mit welcher sie an die Todesrezeptoren binden. FADD und TRADD nutzen ihre N-terminale *death effector domain* (DED), um weitere Proteine mit selbiger Domäne wie Procaspase-8 und -10, RIP1 (*receptor interacting protein* 1), TRAF2 (*TNF receptor-associated factor* 2) oder c-Flip (*cellular CD95/Fas linked inhibitor protein*) in ihre Nähe zu rekrutieren. Solch eine Multiproteinformation aus Todesligand und -rezeptor, Adaptermolekülen und Procaspasen wird als *death inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet. Er bildet das Grundgerüst des extrinsischen Apoptosesignalwegs (**DICKENS** et al., 2012; **KISCHKEL** et al., 1995). Als Pendant zum membrangebundenen DISC-Komplex kann eine Aktivierung der Todesrezeptoren auch zur Ausbildung eines zytoplasmatisch gelösten

Sekundärkomplexes führen (**Lavrik** et al., 2008). Besonders im Falle des TNFR1-induzierten Signalwegs spielen die Sekundärkomplexe IIA und IIB eine große Rolle für die Apoptose (**Wang** et al., 2008). Durch das Prinzip der induzierten Nähe werden die Procaspasen-8 oder -10 am DISC- oder Sekundärkomplex konzentriert und durch autokatalytische Spaltung und Dimerisierung selbst aktiviert (**Hughes** et al., 2009; **Salvesen und Dixit**, 1999). In einigen Zelltypen, den sog. Typ I Zellen wie den Lymphozyten, ist die Aktivierung der Caspase-8 ausreichend, um die daraus resultierende proteolytische Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 und folglich die Apoptosekaskade in Gang zu setzen (**Jost** et al., 2009). In anderen Zellen (Typ II) wiederum ist die Aktivierung der Mitochondrien zur Signalverstärkung durch das Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familienmitglied Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) für den weiteren Ablauf des „programmierten Zelltodes“ erforderlich (**Li** et al., 1998). Als Gegenspieler der Apoptose kann c-Flip mit seiner DED an den DISC- bzw. den TNFR1-Komplex binden und somit eine Aktivierung der Procaspase-8 verhindern (**Golks** et al., 2005).

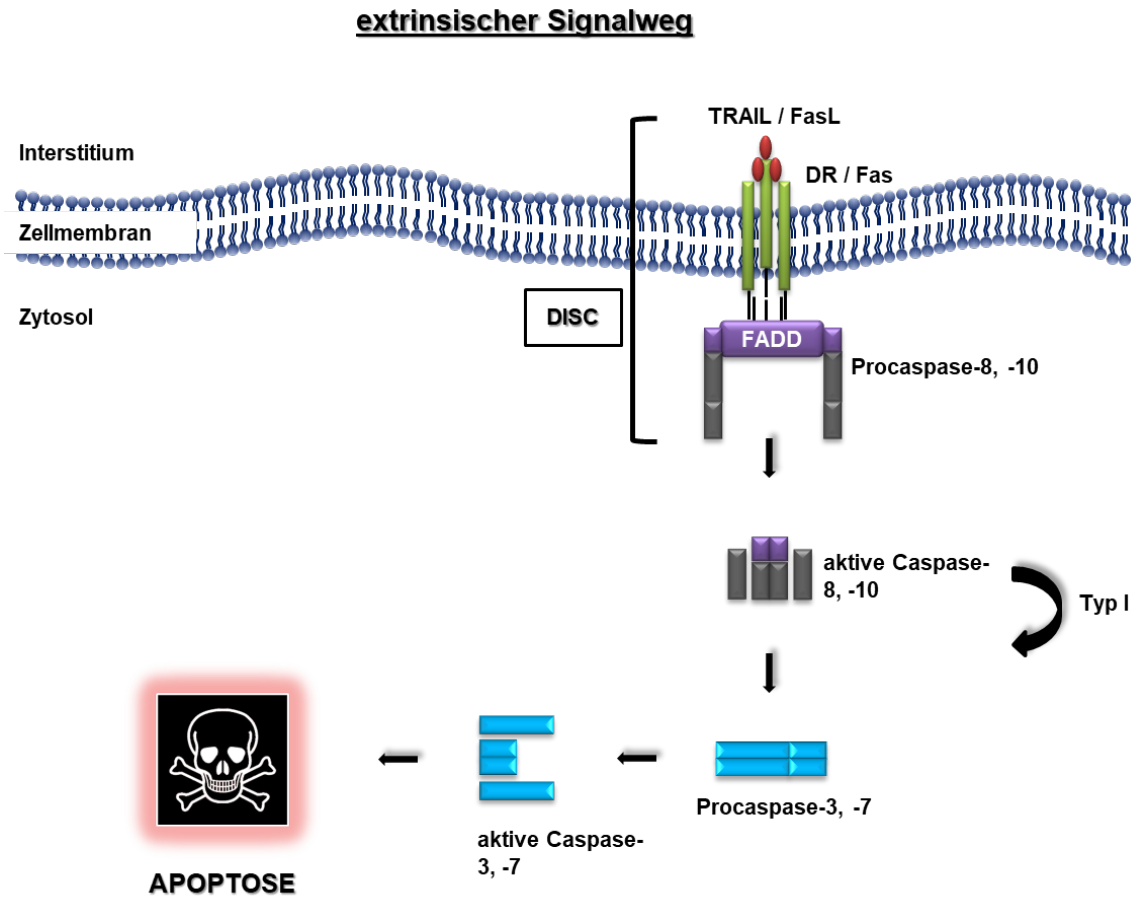


Abb. 2: Extrinsischer Signalweg der Apoptose. TRAIL: TNF-*related apoptosis-inducing ligand*; FasL: Fas-Ligand; DR: *death receptor*; FADD: Fas-*associated death domain protein*; DISC: *death inducing signaling complex*. Modifiziert nach: **HENGARTNER**, 2000.

Bcl-2- Proteinfamilienmitglieder und der intrinsische Signalweg

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie stellen die wichtigsten inhibitorischen Schlüsselproteine des intrinsischen Apoptosesignalwegs dar. Dabei werden pro- und antiapoptotische Bcl-2-Verwandte unterschieden. Das Gleichgewicht zwischen den pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern bestimmt darüber, wie eine Zelle auf apoptotische Stimuli reagiert (**FARROW UND BROWN**, 1996). In Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen Bcl-2-Homologie-(BH)-Domänen können sie in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder, die proapoptotischen Multidomänenproteine sowie die proapoptotischen BH3-*only* Proteine (**ADAMS UND CORY**, 2018; 2002).

Die erste Gruppe der Bcl-2-Proteinfamilie bilden die antiapoptotischen Multidomänenproteine Bcl-2, Bcl-w (*Bcl-2-like protein 2*), Bcl-xL (*Bcl 2-like protein 1, long isoform*), A1 (*Bcl-2 related protein A1*) und Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*), die auch als „Wächter der Apoptose“ bezeichnet werden. Wie in Abb. 3 zu sehen, haben sie alle gemeinsame Homologien in den BH-Domänen 1 bis 4 und sind an Membranen von Mitochondrien, des ERs (endoplasmatischen Retikulums) oder des Zellkerns lokalisiert (**KRAJEWSKI** et al., 1993). Die BH-Domänen 1 bis 3 bilden in den Multidomänenproteinen eine hydrophobe Bindungstasche aus, welche die hydrophobe Seite der amphipathischen α-helikalen BH3-Domäne ihrer proapoptotischen Verwandten binden kann (**DAY** et al., 2005; **HINDS** et al., 2003; **PETROS** et al., 2001; **SATTLER** et al., 1997). Die BH4-Domäne stabilisiert diese Bindungsfurche zusätzlich (**WANG** et al., 2007). Ihre antiapoptotische Wirkung entfalten die Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder beim intrinsischen Apoptosesignalweg, indem sie entweder die BH3-*only* Proteine oder die Effektoren Bax und Bak an ihrer BH3-Domäne binden und deren proapoptotische Funktion inhibieren (**TAN** et al., 2006).

Die proapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder werden anhand ihrer Funktion in Aktivatoren, Sensitivierer und Effektoren unterteilt. Die Proteine Bim und Bid sind Aktivatoren der Apoptose und gehören zur BH3-*only* Proteingruppe. Zusammen mit den Proteinen Bad (*Bcl-2 associated agonist of cell death*), Bik (*Bcl-2 interacting killer*), Noxa, HRK (*Harakiri*), BMF (*Bcl-2 modifying factor)* und PUMA (*p53 (tumor protein p53) upregulated modulator of apoptosis*), die als Sensitivierer der Apoptose fungieren, besitzen sie nur Homologien in der proapoptotischen α-helikalen BH3-Domäne (Abb. 3). Die Sensitiviererproteine gelten als Gegenspieler der Apoptoseinhibitoren Bcl-2, Bcl-w,

Bcl-xL und Mcl-1. Die Sensitiviererproteine sind nicht in der Lage, die Effektorproteine Bax und Bak direkt zu aktivieren. Jedoch können sie die BH3-Bindungsstelle in antiapoptotischen Proteinen blockieren und somit eine Inaktivierung der Aktivatorproteine Bid und Bim oder der Effektorproteine Bak und Bax durch diese verhindern oder sie aufheben (**LETAI** et al., 2002; **WILLIS** et al., 2007, 2005). Der spezifische Bindungspartner hängt dabei vom jeweiligen Sensitiviererprotein ab. So besitzt das Protein Bad eine hohe Affinität zu den Proteinen Bcl-2, Bcl-xL (*Bcl-2-like protein 1, long isoform*) und Bcl-w, jedoch nicht zu Mcl-1 und A1 (*Bcl-2 related protein A1*). Noxa dagegen bindet stark an Mcl-1 und A1, jedoch nicht an Bcl-2, -xL und -w (**CHEN** et al., 2005). Sind die Aktivatoren Bid und Bim also von der Blockierung ihrer BH3-Bindungsstelle durch die antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder befreit und aktiviert, können sie ihre proapoptotischen Fähigkeiten voll entfalten. Dabei aktiviert Bid bevorzugt Bak und das verwandte Protein Bim wirkt überwiegend am Protein Bax (**SAROSIEK** et al., 2013). Somit wird das proapoptotische Signal zum Mitochondrium an die Effektorproteine weitergeleitet. Dabei können die proapoptotischen Bcl-2-Proteine auf der Transkriptionsebene, durch posttranslationale Modifikationen, proteasomalen Abbau oder anhand ihrer subzellulären Lokalisation reguliert werden. So wird beispielsweise die Transkription von PUMA und Noxa nach erfolgter DNA-Schädigung durch p53 als Transkriptionsfaktor hochreguliert (**NAKANO UND VOUSDEN**, 2001; **ODA** et al., 2000).

Die Effektorproteine Bax und Bak sind komplexer aufgebaut und weisen wie das Protein Bok (*Bcl-2-related ovarian killer*) Homologien in den BH-Domänen 1, 2 und 3 auf (**ADAMS UND CORY**, 1998). Sie werden daher als proapoptotische Multidomänenproteine bezeichnet und sind unverzichtbar für die Apoptose (**KORSMEYER** et al., 2000; **WEI** et al., 2001). Bax besitzt an seinem C-terminalen Ende einen Anker aus hydrophoben Aminosäuren, welcher sein Eindringen in Doppelmembranen ermöglicht (**GOPING** et al., 1998). Neben ihren bereits erläuterten Funktionen am Mitochondrium können Bax und Bak an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) binden und dort die Apoptose als Antwort auf ER-Stress induzieren (**ZONG** et al., 2003). Manon und Kollegen konnten zeigen, dass Bax durch das antiapoptotische Bcl-2-Proteinfamilienmitglied Bcl-xL blockiert wird, welches seinerseits von Bad inhibiert werden kann (**MANON** et al., 1997). Im Falle eines Entzugs von Wachstumsfaktoren kann Bad nicht mehr von der Serin-Threonin-Kinase-1 c-Akt phosphoryliert werden und entfaltet seine inhibierende Wirkung an antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen, welche ihrerseits ihre proapoptotischen Verwandten freisetzen (**DATTA** et al., 1997). Beim Effektorprotein Bak wird angenommen, dass neben der direkten Aktivierung durch BH3-*only* Proteine die antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-xL seine Oligomerisierung und Aktivierung verhindern können (**KIM** et al., 2006; **WILLIS** et al., 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass der Sensitivierer PUMA

ebenfalls als Aktivator agiert und die Effektorproteine Bax und Bak anregen kann (**KIM** et al., 2006).

Neben ihrer herausragenden Rolle bei der Apoptose wurden für einige Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie zelltodunabhängige Funktionen bei Signalwegen des Glukosemetabolismus, der Regulation der mitochondrialen Morphologie sowie der Zellzykluskontrolle entdeckt (**DANIAL** et al., 2003; **KARBOWSKI** et al., 2006; **ZINKEL** et al., 2005).

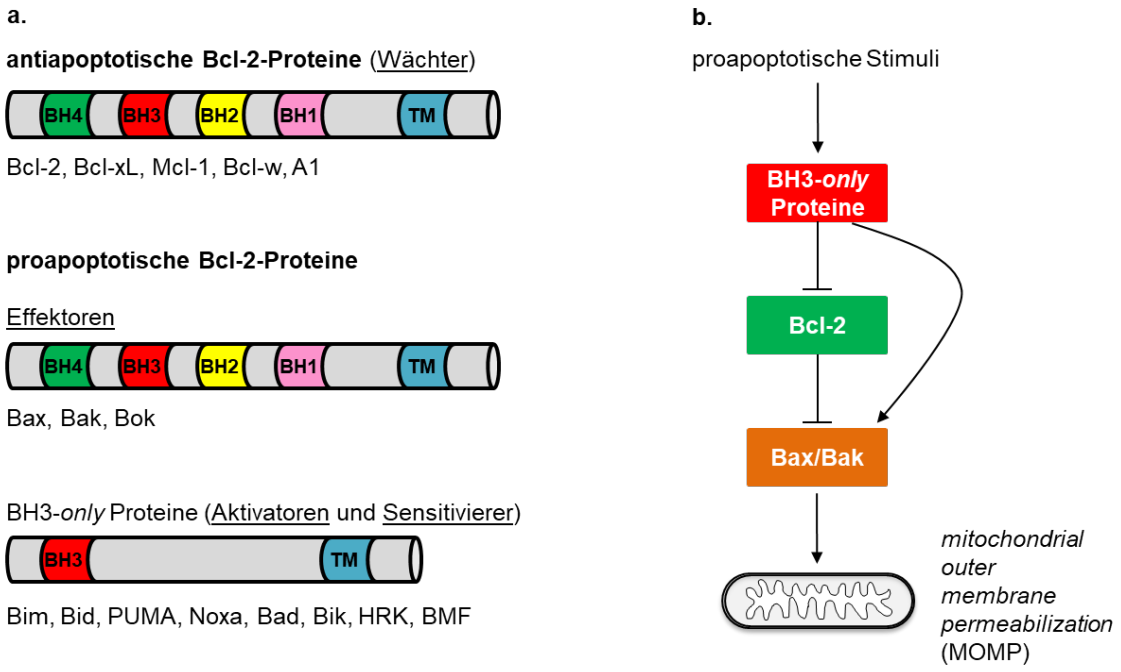


Abb. 3: Bcl-2-Proteinfamilie. a. Homologe Proteindomänen in pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Bcl-2: B-*cell lymphoma* 2; BH: Bcl-2-Homologie; TM: transmembrane Region; Bcl-xL: Bcl-2-*like protein* 1, *long isoform*; Mcl-1: *myeloid cell leukemia* 1; Bcl-w: Bcl-2-*like protein* 2; A1: Bcl-2 *related protein* A1; Bax: Bcl-2-*associated* X *protein*; Bak: Bcl-2 *antagonist/killer* 1; Bok: Bcl-2-*related ovarian killer*; Bim: Bcl-2-*interacting mediator of cell death*; Bid: BH3 *interacting domain death agonist*; PUMA: p53 *upregulated modulator of apoptosis*; Bad: Bcl-2-*associated agonist of cell death*; Bik: Bcl-2-*interacting killer*; HRK: Harakiri; BMF: Bcl-2 *modifying factor*. **b.** Vereinfachte Darstellung des intrinsischen Apoptosesignalwegs. Modifiziert nach (**ADAMS UND CORY**, 2018).

Als Antwort auf intrazelluläre Stressereignisse wie die Schädigung von DNA, den Entzug von Wachstumsfaktoren oder z.B. den oxidativen Stress wird der intrinsische Apoptosesignalweg ausgeführt (Abb. 4). Mithilfe der proapoptotischen Aktivatorproteine Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) und Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) wird das Signal zum Sterben innerhalb der Zelle zum Mitochondrium weitergeleitet. Hiervon leitet sich der synonym gebräuchliche Begriff der mitochondrialen Apoptose ab

(**Green und Llambi**, 2015). Wei und Kollegen konnten zeigen, dass infolge einer Spaltung des zytosolischen Proteins Bid zu tBid (*truncated bid*) es zu seiner Translokation ans Mitochondrium kommt, an dem es das außenmembranständige Bak bindet und dort seinen Konformationswechsel bewirkt (**Wei** et al., 2000). Außerdem besitzen Bim und tBid die Fähigkeit, an das proapoptotische Bax zu binden (**Harada** et al., 2004; **Korsmeyer** et al., 2000). Ob die BH3-*only* Proteine Bim und Bid direkt die Effektorproteine Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und Bak (*Bcl-2 antagonist/killer-1*) binden oder sie doch erst indirekt durch die Bindung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder wie dem Bcl-xL oder dem Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*) deblockieren oder ob beides passiert, ist Gegenstand aktueller Forschung (**Kuwana** et al., 2005; **Willis** et al., 2007; **Huang** et al., 2019). Aktuelle Forschungsergebnisse rücken das indirekte Aktivierungsmodell von Bax und Bak weiter in den Vordergrund. Es wird angenommen, dass sich Bax und Bak nach ihrer Befreiung von Bcl-xL und Mcl-1 selbst aktivieren und somit eigenständig die Apoptose einleiten können (**Huang** et al., 2019). Wie bereits von Wolter und Kollegen nachgewiesen wurde, verlagert sich das monomere aktivierte Bax aus dem Zytosol zum Mitochondrium und entfaltet dort zusammen mit Bak seine proapoptotische Wirkung (**Wolter** et al., 1997). Nach ihrer Aktivierung und Oligomerisierung dringen die Effektorproteine Bax und Bak in die äußere Mitochondrienmembran ein und bilden hier einen *permeability transition pore* (PTP)-Komplex. Diese Pore führt zum Zusammenbruch der oxidativen Phosphorylierung und macht das Mitochondrium durchlässig für proapoptotische Moleküle wie Cytochrom c, Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*), die Serinprotease Omi und andere. Dieser Prozess wird als *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP) bezeichnet (**Green und Llambi**, 2015). Unter Standardbedingungen ist Cytochrom c an der Elektronentransportkette während der oxidativen Phosphorylierung, dem Energiegewinnungsprozess der Zelle, beteiligt und seine Lokalisation ist streng auf den Raum zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran beschränkt (**Tait und Green**, 2010). Die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol führt hier zur Bindung des *apoptotic protease-activating factor 1* (APAF1) und seiner Oligomerisierung (**Zou** et al., 1997). Infolgedessen kommt es zur Hydrolyse des APAF1-Cofaktors dATP (Desoxyadenosintriphosphat) zu dADP (Desoxyadenosindiphosphat) und der Ausbildung eines Multiproteinkomplexes, des sog. Apoptosoms, als Pendant zum DISC-Komplex des extrinsischen Apoptosesignalwegs (**Kim** et al., 2005; **Li** et al., 1997). Das Apoptosom besteht aus sieben radspeichenartig angeordneten Einheiten aus APAF1, dATP und Cytochrom c. Im Zentrum des aktiven Apoptosoms befindet sich die Procaspase-9 (Abb. 4) (**Zou** et al., 1999). Sie bindet mit ihrer CARD (*caspase recruitment domain*) an die N-terminale CARD von APAF1 im Zentrum des sog. Apoptosomrads und wird mittels des bereits erwähnten Prinzips der induzierten Nähe durch Dimerisierung und Autokatalyse im Apoptosom aktiviert

(**Boatright** et al., 2003; **Qin** et al., 1999). Die aktive Initiatorcaspase-9 setzt die Caspasekaskade in Gang, indem sie sich selbst und die nachgeschalteten Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (**Li** et al., 1997).

Neben Cytochrom c werden unter anderem auch die proapoptotischen Moleküle Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 (*high-temperature requirement A2*) und AIF (*apoptosis inducing factor*) aus dem mitochondrialen Zwischenmembranraum ins Zytosol freigesetzt (**Hegde** et al., 2002; **Susin** et al., 1999). Smac und Omi fördern die weitere Aktivierung von Initiatorcaspase-9 und den Effektorcaspasen-3 und -7, indem sie an die BIR (*baclovirus IAP repeat*)-Domänen von XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) binden und seine inhibierende Wirkung auf diese aufheben (**Deveraux** et al., 1997; **Verhagen** et al., 2000). Als Mitglied der IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie inhibiert XIAP in Abwesenheit von proapoptotischen Signalen direkt die Procaspasen-9, -3 und -7 und fördert zudem die Ubiquitinylierung und Proteolyse ihrer aktiven Formen (**Eckelman** et al., 2006; **Suzuki** et al., 2001). Wie Jost und Kollegen zeigen konnten, nimmt XIAP des Weiteren eine wichtige Rolle beim extrinsischen Apoptosesignalweg ein und verbindet diesen so mit dem intrinsischen Signalweg (**Jost** et al., 2009).

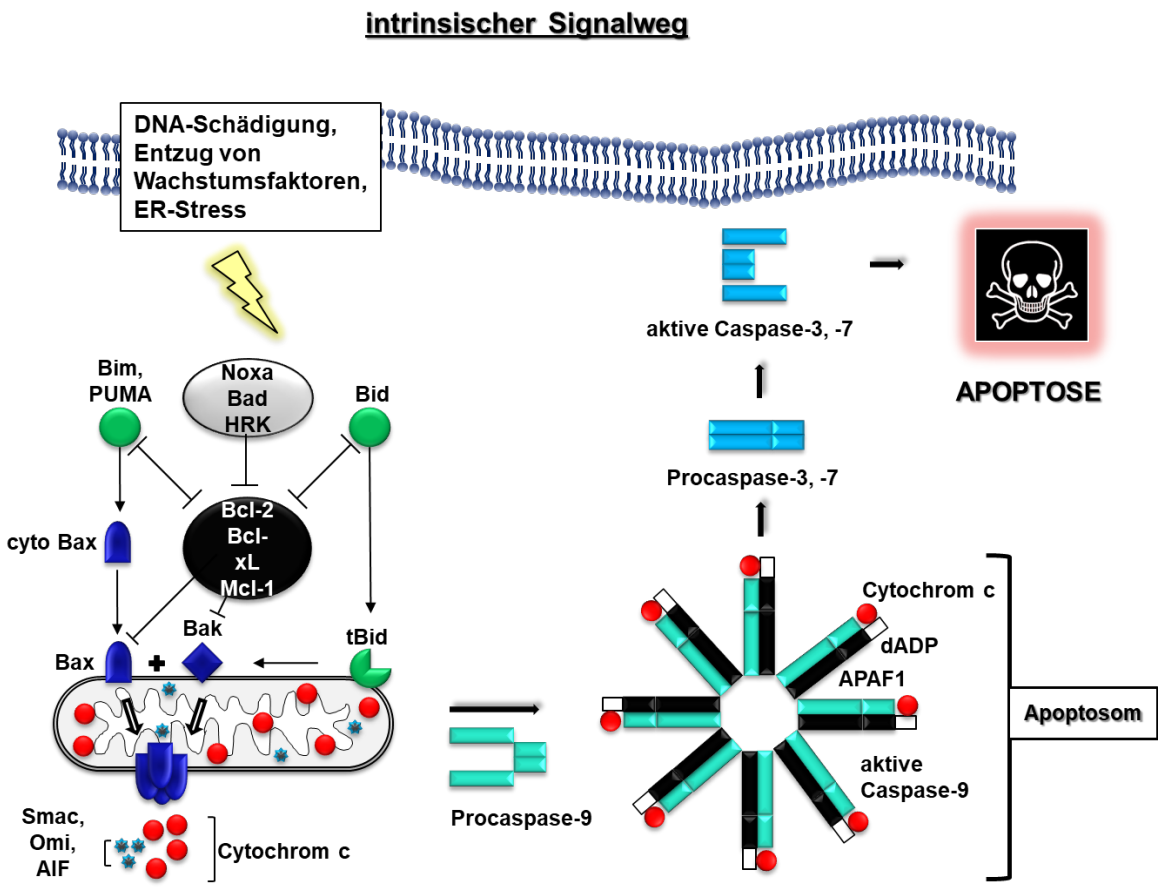


Abb. 4: Intrinsischer Signalweg der Apoptose. Bcl-2: B-*cell lymphoma* 2; Bcl-xL: Bcl-2-*like protein* 1, *long isoform*; Mcl-1: *myeloid cell leukemia* 1; cyto Bax: zytoplasmatisches Bcl-2-*associated* X *protein*; Bak: Bcl-2 *antagonist*/*killer* 1; Bim: Bcl-2-*interacting mediator of cell death*; tBid: *truncated* BH3 *interacting domain death agonist*; PUMA: p53 *upregulated modulator of apoptosis*; Bad: Bcl-2-*associated agonist of cell death*; HRK: Harakiri; Smac: *second mitochondria-derived activator of caspase*; AIF: *apoptosis inducing factor*; APAF1: *apoptotic protease-activating factor* 1; dADP: Desoxyadenosindiphosphat. Modifiziert nach (**ADAMS UND CORY**, 2018).

Der lysosomal-mitochondriale Signalweg

Neben der oben beschriebenen Apoptoseregulation durch Caspasen existieren weitere Proteasen, welche die Apoptose caspaseabhängig oder auch -unabhängig einleiten können. Im Zuge der Weiterleitung von verschiedenen internen und externen Apoptosestimuli durch p53, Bim, Bid, Bax oder Caspase-8 innerhalb der Zelle kommt es zur lysosomalen Membranpermeabilisierung (LMP) und der Freisetzung von spezifischen Hydrolasen, vorwiegend den Cathepsinen, aus dem Lysosom ins Zytoplasma (**FOGHSGAARD** et al., 2001; **KÅGEDAL** et al., 2005; **WERNEBURG** et al., 2002; **YUAN** et al., 2002). Hydrolasen sind Enzyme, die Kohlenstoffverbindungen unter Verbrauch von Wasser spalten. Cathepsine können hiermit einerseits überlebenswichtige zelluläre Proteine abbauen und sind andererseits in der Lage weitere Hydrolasen und Enzyme wie Caspasen zu aktivieren. Die Spaltung von Bid und Caspase-2 durch die Cathepsine B und D führt zur Induktion von MOMP und nachfolgender Apoptose auf intrinsischem Wege (**GUICCIARDI** et al., 2005). Ein von Chen und Kollegen entdecktes Protein namens LAPF (*lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology and FYVE domains*) scheint LMP, MOMP und folglich die Apoptose auf eine caspaseunabhängige Weise durch eine mögliche Freisetzung von AIF (*apoptosis inducing factor*) auszulösen (**CHEN** et al., 2005; **MODJTAHEDI** et al., 2006).

1.3.2 Die Bedeutung von Apoptose für die Therapie maligner Tumoren

Die Resistenz gegenüber Todesstimuli wurde von Hanahan und Weinberg als eines des Hauptcharakteristika von Tumorzellen definiert (**HANAHAN UND WEINBERG**, 2000). Defekte im Apoptosesignalweg spielen sowohl bei der Karzinogenese als auch bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika eine wichtige Rolle. So können fehlerhafte Apoptoseprozesse zur Folge haben, dass maligne entartete Zellen Mutationen erwerben. Diese erlauben es ihnen wiederum, die Apoptose zu umgehen und

sich ungehemmt zu vermehren. Potenzielle Mutationen können theoretisch überall entlang des komplexen Apoptosesignalwegs entstehen und die Zelle resistent gegenüber Zelltodsignalen machen. Ihre Effekte werden dabei vereinfachend in drei verschiedene Hauptgruppen eingeteilt: Die Dysbalance zwischen den pro- und antiapoptotischen Proteinen, die gestörte Caspasefunktion und die Beeinträchtigung im Signalweg der Todesrezeptoren (**WONG**, 2011).

Störungen im Gleichgewicht zwischen den anti- und proapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptose in Tumorzellen. Das Gen des antiapoptotischen Bcl-2 wurde bereits 1984 von Tsujimoto und Kollegen in humanen Zellen des follikulären B-Zelllymphoms entdeckt (**TSUJIMOTO** et al., 1985). 85% aller Lymphome dieser Spezies zeigen eine typische t(14;18) Translokation mit konsekutiver Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und einen für die Tumorzellen daraus resultierenden Überlebensvorteil (**ADACHI** et al., 1990; **BÖCKER** et al., 2012; **IQBAL** et al., 2004; **STRASSER** et al., 1990). Da die Anwendung von Chemotherapeutika häufig zur Induktion von Apoptose führt, lassen sich Tumorzellen mit Aberrationen an apoptotischen Signalwegen deutlich schlechter eliminieren. So sind Zellen mancher Tumorarten in der Lage, den proteasomalen Abbau des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 zu blockieren und dadurch eine Resistenz gegenüber tubulininhibierenden Chemotherapeutika zu erlangen (**WERTZ** et al., 2011). Für die Überexpression des antiapoptotischen Bcl-xL wurde ebenfalls eine Korrelation mit der Chemotherapieresistenz von Tumorzellen nachgewiesen (**AMUNDSON** et al., 2000). Doch auch die Inaktivierung von proapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern wie Bax, Bak oder Bad konnte in maligne entarteten Zellen demonstriert werden (**KONDO** et al., 2000; **LEE** et al., 2004; **RAMPINO** et al., 1997).

Basierend auf diesen Beobachtungen hat die Arbeitsgruppe um Certo die Methode des sogenannten „BH3-*Profiling*“ etabliert. Beeinflusst durch verschiedene tumoreigene innere und äußere Stressfaktoren wie die genetische Instabilität oder den Nährstoffmangel bei Hypoxie, reagieren manche Tumorzellen sensibler auf Chemotherapeutika als andere, sie sind „bereit zum Sterben“ oder „*primed for death*“ (**CERTO** et al., 2006). Solche Tumorzellen exprimieren stressbedingt deutlich größere Mengen an proapoptotischen BH3-*only* Proteinen. Eine kompensatorisch erhöhte Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine neutralisiert jedoch die BH3-*only* Proteine und die Zelle überlebt. Kommt es im Zuge einer Chemo- oder Radiotherapie zu einer Zunahme von tumorzellschädigenden Ereignissen, steigen die Expressionsraten der proapoptotischen BH3-*only* Proteine an. Der Überschuss dieser fördert nachfolgend die Aktivierung von Bak und Bax und die Tumorzelle begeht „programmierten Selbstmord“ (**DENG** et al., 2007). Das „BH3-*Profiling“* bietet neben der Identifizierung anfälliger Tumorzellen die Möglichkeit genau zu bestimmen, von welchen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen das Überleben der

Tumorzelle abhängt. Beide Determinanten haben dabei direkte klinische Bedeutung für die Prognose der Patienten bei zielgerichteter Antitumortherapie und liefern Aussagen über den Effekt dieser sowohl auf Tumor- als auch auf Normalgewebe (**CHONGHAILE** et al., 2011). Die Methode des BH3-*Profiling* wird in dieser Arbeit für die Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 durchgeführt, um apoptotische Prozesse, insbesondere die Abhängigkeit von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen, zu charakterisieren.

Wurden die verantwortlichen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder einmal identifiziert, können sie anschließend gezielt therapeutisch beeinflusst und die Apoptose in Tumorzellen induziert werden. Die Gruppe der BH3-Mimetika greift die strategische BH3-Domäne der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine an und blockiert diese. Das in dieser Arbeit eingesetzte oral verfügbare ABT-263 (Navitoclax) bindet selektiv die Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, jedoch nicht Mcl-1 oder A1 (**OLTERSDORF** et al., 2005). Seine Weiterentwicklung erbrachte das Bcl-2-selektive ABT-199 (Venetoclax), welches aufgrund der mangelnden Bcl-xL-Bindung zu keiner Thrombozytopenie führt (**SOUERS** et al., 2013). In Ergänzung hierzu haben die Kollegen um Leverson und Kotschy einige kleinmolekulare Mcl-1-selektive BH3-Mimetika entwickelt, deren wichtigste Vertreter A-1210477 und S63845 sind (**LEVERSON** et al., 2015; **KOTSCHY** et al., 2016). Sowohl A-1210477 als auch der Bcl-2-selektive Inhibitor ABT-199 und der Bcl-xL-selektive Inhibitor A-1331852 wurden bereits an embryonalen Rhabdomyosarkomzellen getestet. Wenngleich eine Monotherapie mit einem der BH3-Mimetika zu keinem Zelltod bei Rhabdomyosarkomzellen führte, so konnte ein synergistischer Effekt mit konventionellen Chemotherapeutika Vincristin und Etoposid nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Kombination aus dem Bcl-xL-selektiven Inhibitor A-1331852 und Vincristin oder Etoposid in embryonalen Rhabdomyosarkomzellen die größte zytotoxische Wirkung (**FAQAR-UZ-ZAMAN** et al., 2018). Aktuelle Studien befassen sich außerdem mit dem Effekt einer kombinierten Anwendung von verschiedenen BH3-Mimentika auf das Überleben von Rhabdomyosarkomzellen. Die gleichzeitige Inhibition von Bcl-xL und Mcl-1 scheint den größten Erfolg bei der Induktion von Apoptose in Rhabdomyosarkomzellen zu erzielen. Dies unterstreicht die Abhängigkeit der Rhabdomyosarkomzellen von den antiapoptotischen Proteinen Bcl-xL und Mcl-1 (**KEHR** et al., 2020).

Bei vielen Tumoren wurde außerdem eine Überexpression der antiapoptotischen IAP-Familienmitglieder wie Survivin, XIAP, cIAP1 oder cIAP2 sowie ihre negative Korrelation mit der Überlebensprognose von Tumorpatienten beobachtet (**AMBROSINI** et al., 1997; **DAI** et al., 2003; **IMOTO** et al., 2001; **LOPES** et al., 2007; **MESRI** et al., 2001). Aufgrund dieser Entdeckungen wurden zahlreiche IAP-Antagonisten, sog. Smac-Mimetika, entwickelt, welche die proapoptotische Wirkung des endogenen Smac-Moleküls auf IAPs nachahmen und vor allem in Kombination mit

Standardtherapeutika bereits positive Ergebnisse geliefert haben (**MANNHOLD** et al., 2010; **UENO** et al., 2016). Zur Verstärkung der proapoptotischen Wirkung der Bcl-2-Proteine wurden ferner kleine Moleküle identifiziert, welche als direkte Bax-Aktivatoren fungieren (**GAVATHIOTIS** et al., 2012; **XIN** et al., 2014).

Sowohl beim intrinsischen als auch dem extrinsischen Apoptosesignalweg spielen neben Defekten der Bcl-2-Proteine auch Funktionsstörungen von Caspasen eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren und Chemotherapieresistenzen. Mit dieser Problematik befassen sich sowohl medikamentöse als auch genetische Therapieansätze. Studien zur Anwendung im Rhabdomyosarkom fehlen jedoch bislang (**LI** et al., 2007; **PHILCHENKOV** et al., 2004; **ROHN** und **NOTEBORN**, 2004; **VAN ERP** et al., 2018).

Eine weitere Komponente der Onkogenese und Chemotherapieresistenz von Tumorzellen stellen genetische Defekte an ihren Todesrezeptoren dar. Mutationen führen zu einer verminderten Expression oder Aktivität der Todesrezeptoren auf der Oberfläche von Krebszellen und fördern somit ihre Resistenz gegenüber extrinsischen Apoptosestimuli (**FRIESEN** et al., 1997; **PITTI** et al., 1998; **SHEIKH** et al., 1999). Während Versuche zur Antitumortherapie mit Agonisten an CD95 und TNFα-Rezeptoren deutliche Toxizität gegenüber dem Normalgewebe gezeigt haben, war der präklinische Einsatz von rekombinantem TRAIL (TNF-*related apoptosis-inducing ligand*) zunächst sehr vielversprechend (**ASHKENAZI**, 2015; **SCHAEFER** et al., 2007). Klinische Studien konnten jedoch bisher weder für rekombinantes TRAIL (Dulanermin) noch für agonistische Antikörper der TRAIL-Rezeptoren DR4/5 (Mapatumumab, Lexatumumab, AMG 655, Apomab) als Mono- oder Kombinationstherapie eine signifikante Wirksamkeit zeigen (**CAMIDGE** et al., 2007; **LORUSSO** et al., 2007; **MERCHANT** et al., 2012; **SORIA** et al., 2010, 2011; **TRARBACH** et al., 2010; **YOUNES** et al., 2010). In der Phase-II-Studie NCT01327612 wurde der Effekt des DR5-Antikörpers Conatumumab in Kombination mit konventioneller Chemotherapie oder dem IGF-1R-spezifischen Antikörper Ganitumab bei Sarkompatienten untersucht (**AMGEN**, 2020).

1.4 Der Apoptoseinhibitor ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain)

Als multifunktioneller Inhibitor der Apoptose nimmt das antiapoptotische Protein ARC (*apoptosis repressor with caspase recruitment domain*) Einfluss sowohl auf den intrinsischen als auch den extrinsischen Signalweg (**NAM** et al., 2004). ARC wird durch das Gen Nol3 codiert, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 16 befindet und aus 4 Exons und 3 Introns besteht. Die Exons 2, 3 und 4 liegen der Expression von ARC

zugrunde. Das humane ARC-Protein setzt sich bei einem Molekulargewicht von 22,629 kDa aus 208 Aminosäuren zusammen und wird von zwei funktionellen Domänen gebildet (**Koseki** et al., 1998). Die Entdeckung sowie zum größten Teil auch die Funktion von ARC beruhen auf seiner N-terminalen Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), mithilfe derer es in der Lage ist, diverse Interaktionen zu proapoptotischen Proteinen einzugehen (**Koseki** et al., 1998; **Nam** et al., 2004). Die CARD gehört zur Familie der Todesdomänen, ihre Struktur ist jedoch einzigartig und unterscheidet sich von den übrigen Todesdomänen durch die Abwesenheit der Faltungsuntereinheit H6 (**Jang** et al., 2015). Das C-terminale Ende von ARC enthält die saure P/E-Domäne, eine prolin- und glutaminsäurereiche Proteinregion.

Beim extrinsischen Apoptosesignalweg greift ARC inhibitorisch in die Bildung des proapoptotischen DISC-Komplexes ein. Mit seiner N-terminalen Domäne CARD geht ARC Interaktionen mit der *death domain* (DD) von Fas/CD95 und FADD sowie der *death effector domain* (DED) von Procaspase-8 und -2 ein und inaktiviert die entsprechenden Proteine (**Koseki** et al., 1998; **Nam** et al., 2004). Auf diese Weise werden extrinsische Apoptosestimuli nicht über diese Proteine hinaus in die Zelle weitergeleitet.

Um den intrinsischen Apoptosesignalweg zu inhibieren, werden beide Funktionsdomänen von ARC eingesetzt. Die N-terminale CARD bindet an den C-Terminus von Bax sowie an die BH3-Domänen von PUMA und Bad und neutralisiert so diese proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder (**Gustafsson** et al., 2004; **Li** et al., 2008; **Nam** et al., 2004). Mit seiner P/E-Domäne hemmt ARC außerdem die Tetramerisierungsdomäne von p53 im Zellkern und induziert die Translokation von p53 ins Zytosol. Die Translokation ins Zytosol hemmt p53 in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor im Zellkern und blockiert somit zumindest einen Teil seiner proapoptotischen Wirkung (**Foo** et al., 2007).

Mithilfe seiner sauren P/E-Domäne ist ARC darüber hinaus in der Lage, aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzte Ca^{2+}-Ionen im Zytosol abzupuffern und somit die ER-induzierte intrinsische Apoptose z.B. bei Hypoxie oder oxidativem Stress zu hemmen (**Jo** et al., 2004).

Jo und Kollegen konnten weiter zeigen, dass wiederum größere Mengen an zytosolischem Ca^{2+} zu einer Störung der Interaktion zwischen ARC und Procaspase-8 führen (**Jo** et al., 2004). Eine Phosphorylierung von ARC am Threoninrest auf Position 149 in seiner P/E-Region durch die Caseinkinase II (CK2) scheint dabei essenziell zu sein für die Translokation von ARC zum Mitochondrium und seine dortige Assoziation mit Procaspase-8 (**Li** et al., 2002; **Wang** et al., 2015).

Neben seiner herausragenden Bedeutung für die Apoptosehemmung spielt ARC außerdem eine große Rolle bei einem anderen TNFα-induzierten Prozess des Zelltodes, der Nekrose (**An** et al., 2013; **Kung** et al., 2014). Hier geht es mithilfe seiner CARD eine

direkte Interaktion mit dem TNFα-Rezeptor 1 ein und verhindert somit die Bildung des Nekrosekomplexes I (**KUNG** et al., 2014).

1.4.1 Die Rolle von ARC in nicht-tumorösem Gewebe und in Tumoren

ARC in Muskel- und Hirnzellen, pankreatischen β-Zellen und im Lebergewebe

Bislang wurde die Expression und Wirkweise von ARC in zahlreichen nicht-neoplastischen Geweben wie den Muskelzellen, aber auch in Gehirn- und Bauchspeicheldrüsenzellen untersucht.

Der initiale Nachweis von ARC in Proben der Skelett- und Herzmuskulatur ließ zunächst vermuten, dass es überwiegend in ausdifferenzierten Zellen exprimiert wird und für ihre Apoptoseresistenz und Langlebigkeit mit verantwortlich ist (**KOSEKI** et al., 1998). Bereits ein Jahr später konnten Ekhterae und Kollegen zeigen, dass ARC unter hypoxischen Bedingungen, ähnlich denen bei einem Herzinfarkt, Kardiomyozyten von Ratten vor der Apoptose bewahrte. Gerade in kritischen pathophysiologischen Situationen wie der biomechanischen Beanspruchung des Herzmuskels bei Bluthochdruck oder der Minderversorgung mit Sauerstoff bei Ischämie ist ARC in hohem Maße kardioprotektiv. Seine Aktivierung nach stattgehabtem Herzinfarkt limitierte z.B. den Umbau von tierischen Herzmuskelzellen (**DONATH** et al., 2006; **EKHTERAE** et al., 2011). Die kardioprotektive Wirkung von ARC konnten Gustafsson und Kollegen durch das Infundieren des Fusionsproteins TAT (*trans-activator of transcription*)-ARC in „gestresste“ Rattenherzen nachweisen (**GUSTAFSSON** et al., 2004). Umgekehrt induzierte eine chronisch-arterielle Hypertonie einen signifikant verringerten ARC-Proteinspiegel in der Herz- und Skelettmuskulatur von Ratten sowie in der glatten Muskulatur ihrer Aorta. Die Abwesenheit von ARC in Tiermodellen zu Hypertonie oder kardialer Ischämie ging ferner mit einer erhöhten Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten einher und korrelierte mit einer gesteigerten Inzidenz für Kardiomyopathie bei den Versuchstieren (**DONATH** et al., 2006; **QUADRILATERO UND BLOEMBERG**, 2010; **QUADRILATERO UND RUSH**, 2008). Auch bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz konnte eine verringerte ARC-Proteinkonzentration bei unverändert gebliebener mRNA (*messenger ribonucleic acid*)-Konzentration nachgewiesen werden (**DONATH** et al., 2006). Dies deutet auf eine posttranslationale Destabilisierung des humanen ARC-Proteins hin und seinen Abbau in Proteasomen oder Lysosomen (**LI** et al., 2014; **NAM** et al., 2007). Die Ubiquitin E3 Ligase MDM2 (*mouse double minute 2*) ist beispielsweise in der Lage, den proteasomalen Abbau von ARC und p53 zu fördern (**FOO** et al., 2007a; **HAUPT** et al., 1997). Letzteres übt ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf ARC aus, indem es als Transkriptionsfaktor seine Expression als Antwort auf Hypoxie oder oxidativen Stress blockiert (**LI** et al., 2008).

Interessanterweise zeigte die Abwesenheit von ARC unter Ruhebedingungen keine Konsequenzen. Gleichwohl führte eine Überexpression von ARC zu einem Anstieg der Kardiomyozytenzahl und einer verbesserten Herzmuskelkontraktion nach postischämischer Reperfusion (**Donath** et al., 2006; **Pyo** et al., 2008).
Der Transkriptionsfaktor FOXO3a (*forkhead box O3a*) kann die Ca^{2+}-assoziierte Apoptose in Kardiomyozyten dadurch hemmen, dass es direkt an den Promotor von ARC bindet und diesen somit aktiviert (**Lu** et al., 2013). Eine erhöhte Ca^{2+}-Konzentration im Zytosol resultiert andererseits in der Aktivierung der endogenen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin. Als Gegenspieler von Caseinkinase II (CK2) deaktiviert Calcineurin ARC durch seine Dephosphorylierung (**Tan** et al., 2008). Ein Gleichgewicht zwischen CK2, FOXO3a und Calcineurin ist somit essenziell für die antiapoptotische ARC-Wirkung in Herzmuskelzellen bei Hypoxie oder oxidativem Stress (**Lu** et al., 2013; **Tan** et al., 2008). Eine an Kaninchen durchgeführte Studie deckte des Weiteren eine mögliche positive Korrelation zwischen dem endogen produzierten weiblichen Hormon Östrogen und dem Überleben nach Herzinfarkt auf. Durch eine Hochregulation der myokardialen ARC-Expression übte Östrogen einen positiven Einfluss auf die postischämische Prognose von Versuchstieren aus (**Bouma** et al., 2010). Neben seiner kardioprotektiven Funktion bei Herzinfarkt und Hypertonie scheint ARC außerdem eine wichtige Rolle bei der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie zu spielen. Dabei bedingt die MicroRNA-532-3p eine Herunterregulation der ARC-Expression nach Doxorubicingabe *in vitro* (**An** et al., 2009; **Wang** et al., 2015).
Abgesehen von seiner zellprotektiven Funktion in der quergestreiften Muskulatur des Herzens und des Bewegungsapparats, zeigte ARC allerdings auch eine fördernde Wirkung auf die Entstehung der pulmonalen Hypertonie. Erkrankte Patienten wiesen hypoxiebedingt eine erhöhte Rate an Umbauvorgängen in ihrer arteriellen Lungenstrombahn auf, die mit erhöhten ARC-Proteinspiegeln in glatten Muskelzellen dieser Gefäße einherging. Die sonst so vorteilhafte Apoptoseinhibition durch ARC scheint in diesem Zusammenhang einen negativen Effekt zu haben. So begünstigt sie das Überleben von hypoxisch veränderten Gefäßmuskelzellen, welches zur Hypertrophie und nachfolgend zu einer kritischen Verengung der Lungenstrombahn führen kann (**Zaiman** et al., 2011).
Ein unerwünschter Effekt von ARC wird ebenfalls im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer postuliert. Eine ARC-Überexpression in Gehirnproben verstorbener Alzheimerpatienten stand einer eher niedrigen Expression in tierischem Normalgewebe gegenüber und könnte die Elimination geschädigter Neurone verhindern (**Abmayr** et al., 2004; **Engidawork** et al., 2001). Ähnlich wie beim Modell der arteriellen Hypertonie geht eine Minderversorgung des Gehirns mit Sauerstoff mit einer Reduktion des ARC-Proteinspiegels in Versuchstieren einher. Unter ischämischen Bedingungen führte dies zu

einer Erhöhung der Vulnerabilität von Neuronen des tierischen Hippocampus (**HONG** et al., 2003). Auch die chronische Einnahme von Alkohol korrelierte mit einer gesunkenen ARC-Proteinexpression im Kleinhirn untersuchter Mäuse (**REN** et al., 2009). Gleichwohl konnten unter Ruhebedingungen keine Verhaltensänderungen oder histologischen Auffälligkeiten im Gehirn von Tieren nach einem *Knock-out* von ARC beobachtet werden (**DONATH** et al., 2006).

Die New Yorker Arbeitsgruppe um Wendy McKimpson, bei der die Verfasserin dieser Arbeit mitgewirkt hat, entdeckte eine starke Expression von ARC in humanen pankreatischen β-Zellen, die für die endokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse unabdingbar sind und überwiegend Insulin produzieren. Im Zuge von ER-Stress wirkte ARC stark antiapoptotisch auf die β-Zellen. Seine verminderte Aktivität in diesen Zellen könnte so einen wichtigen Pathomechanismus bei der Entstehung von Typ-2 Diabetes darstellen (**MCKIMPSON** et al., 2013).

Durch eine direkte Bindung der CARD von ARC an die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) 1 und 2 in Leberzellen sowie seine Interaktion mit bereits bekannten Akteuren des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalwegs wie Bax, Bad, Fas, FADD und Procaspase-8, wirkt ARC hepatoprotektiv. Es verhinderte die Fas-Liganden- oder TNFα-induzierte Apoptose bzw. Nekrose von Leberzellen bei akutem Leberversagen oder im Falle einer Intoxikation mit Acetaminophen, einem Zwischenprodukt von Paracetamol (**AN** et al., 2012, 2013).

Die Rolle von ARC in Tumoren

Wenngleich die „Zellschutzfunktion“ des antiapoptotischen Proteins ARC in „Normalgeweben“ meist positive Effekte mit sich bringt, ist sie in Tumorzellen unerwünscht. Für viele humane Tumorarten epithelialer Herkunft wie das Kolon-, Mamma-, Ovarial-, Zervix-, Nieren- sowie das Kopf-/Hals-Karzinom wurde eine Überexpression von ARC im Vergleich zu ihrem ursprünglichen Normalgewebe nachgewiesen (**HEIKAUS** et al., 2008; **MERCIER** et al., 2005, 2008; **WU** et al., 2013). Durch diese ARC-Überexpression erlangen die Tumorzellen einen Überlebensvorteil gegenüber tumorexternen und -internen Stressfaktoren (**CHEN** et al., 2008; **ZHANG UND HERMAN**, 2008). Im Falle einer Hypoxie steigt die Expression von ARC in vielen Tumorarten an. In Zellen des renalen Klarzellkarzinoms bindet der Transkriptionsfaktor HIF1α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) an das *hypoxia response element* (HRE) des Nol3-Gens und regt so die ARC-Expression als Antwort auf den Sauerstoffmangel an (**RAZORENOVA** et al., 2014).

Endogen exprimiertes ARC begünstigte die Proliferation von Brustkrebszellen in Mäusen und trug folglich zum Anstieg der Tumorlast im Vergleich zu ARC-*Knock-out*-Mäusen bei. Die Herunterregulation der ARC-Expression in Tierzellen senkte ferner die Invasivität der Brustkrebszellen sowie ihre Konzentration im Blutkreislauf und hemmte somit die

Ausbildung von Fernmetastasen. Außerdem förderte ARC die Therapieresistenz sowohl von Primärtumoren in der Brust als auch ihrer Metastasen gegenüber Apoptoseinduktoren wie dem Anthrazyklin Doxorubicin oder den therapeutisch eingesetzten γ-Strahlen (**MEDINA-RAMIREZ** et al., 2011; **MERCIER** et al., 2005). Beide führen zu DNA-Schäden an betroffenen Zellen und aktivieren somit den intrinsischen Apoptosesignalweg.

In Zellen des Magen- und Zervixkarzinoms trug eine Überexpression von ARC ebenfalls zur Apoptose- und folglich Doxorubicinresistenz bei. Hier bindet es an PUMA, verhindert dadurch die Akkumulation des *dynamin related protein* 1 (DRP1) in Mitochondrien und inhibiert die mitochondriale Spaltung sowie die Freisetzung des proapoptotischen Smac-Moleküls (**LI** et al., 2010; **WANG** et al., 2009).

Eine wichtige Voraussetzung für die ARC-vermittelte Doxorubicinresistenz stellt laut Wang und Kollegen seine Phosphorylierung am Threoninrest auf Position 149 durch die Caseinkinase II dar. Die posttranslationale Modifikation scheint ARC eine Translokation aus dem Zytosol zum Mitochondrium zu ermöglichen, an dem es anschließend seine antiapoptotische Wirkung entfalten kann (**WANG** et al., 2015).

Die ARC-Wirkung bei Chemotherapie ist nicht nur auf Doxorubicin beschränkt. In menschlichen Glioblastomzellen führte ein ARC-*Knock-down* zu einem gesteigerten Ansprechen der Tumorzellen auf den Topoisomerase-II-Inhibitor Teniposid. In Gehirnproben der entsprechend erkrankten Tumorpatienten wurde verglichen mit dem Gewebe gesunder Patienten zudem eine Überexpression von ARC nachgewiesen (**WANG** et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse wurden an Geweben nasopharyngealer Karzinome erhoben, wobei eine Resistenz gegenüber Cisplatin und γ-Strahlen mithilfe von ARC überwunden werden konnte (**WU** et al., 2013).

Neben soliden Tumoren spielt ARC auch eine Rolle bei Neoplasien der hämatologischen Reihe. Seine Expression im Blut und Knochenmark von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) war umgekehrt proportional zum Langzeitüberleben dieser nach einer Behandlung mit Standardchemotherapeutika. ARC besitzt somit wahrscheinlich eine klinische Prognoserelevanz für die AML (**CARTER** et al., 2011).

Weitere Mechanismen regulieren das für ARC codierende Nol3-Gen auf der Transkriptionsebene. So aktivieren die GTPasen (Guanosintriphospat) H-Ras (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) und N-Ras (*neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog*) den Promoter von Nol3 in Abhängigkeit von MEK/ERK (mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase/extrazelluläre signalregulierte Kinase) und stimulieren auf diese Weise die Expression von ARC. Zusätzlich hemmt N-Ras posttranslational die Ubiquitinylierung und den proteasomalen Abbau von ARC (**WU** et al., 2010). Mutationen in Ras-Genen lassen sich in etwa einem Drittel aller humanen Tumoren nachweisen. Hier fördern sie das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen und bieten ihnen Ausweichmöglichkeiten gegenüber diversen Todessignalen (**STEPHEN** et al., 2014).

Zur Bedeutung der Lokalisation von ARC innerhalb der Tumorzelle besteht noch immer keine einheitliche Meinung. Sie variiert in Abhängigkeit vom Tumortyp enorm und lässt derzeit keine eindeutigen Schlüsse auf eine mögliche Prognoserelevanz zu. So befindet sich ARC sowohl im Zytosol als auch im Zellkern von Brustkrebszellen, wobei benignes Brustgewebe eine überwiegend nukleäre ARC-Lokalisation aufweist (**MERCIER** et al., 2005). In Zellen des humanen Kolon-, Pankreas-, Prostata- und Zervixkarzinoms, des Glioblastoms und des kleinzelligen Lungenadenokarzinoms lässt sich ARC hauptsächlich im Zellkern nachweisen (**WANG** et al., 2005). In Zellen des humanen Zervix- und Magenkarzinoms sowie des Melanoms scheint ARC indes auf das Zytoplasma begrenzt zu sein (**CHEN** et al., 2008; **WANG** et al., 2009). Während es keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Malignitätsgrad und der ARC-Lokalisation beim Mammakarzinom zu geben scheint, verfügen lediglich die Zellen des mäßig differenzierten humanen Kolonkarzinoms über nukleäres ARC. Annähernd alle Kolonkarzinomzellen zeigen eine zytoplasmatische ARC-Lokalisation während ARC in benignen Darmzellen nur sehr selten exprimiert wird (**MERCIER** et al., 2008).

Im Gegensatz zu gutartigen Brustdrüsenzellen ist ARC in benignem Muskelgewebe und in Nervenzellen des Hippocampus vor allem zytoplasmatisch angesiedelt (**MERCIER** et al., 2008).

Als einzigartiger Inhibitor sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptosesignalwegs bietet ARC einen vielversprechenden Ansatz für die Diagnostik und Therapie maligner Tumoren. Seine antiapoptotische Funktion in nicht-tumorösem Gewebe könnte dabei jedoch einen limitierenden Faktor beim Einsatz von ARC-Antagonisten darstellen. Es ist daher von besonderer Bedeutung, die genauen Pathomechanismen von ARC in benignem und malignem Gewebe aufzudecken, um die Tumorzellen gezielt angreifen zu können.

Trotz der weitgehenden Erforschung der Rolle von ARC in gutartigen Skelett- und Herzmuskelzellen, fehlen bislang Studien zu seiner Bedeutung in maligne entarteten Muskelzellen. Beispielhaft dafür sollen in dieser Arbeit die Skelettmuskelzellen des Rhabdomyosarkoms untersucht werden.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Rhabdomyosarkom ist der häufigste maligne Weichteiltumor bei Kindern. Doch trotz aggressiver Therapiemethoden, die mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind, wird das Gesamtüberleben beim fortgeschrittenen metastasierten Rhabdomyosarkom als schlecht angesehen. Grund dafür sind vor allem zahlreiche primäre oder erworbene Resistenzen der Tumorzellen gegenüber Chemo- und Strahlentherapeutika, welche unter anderem auf eine Hemmung der Apoptose zurückzuführen sind. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Identifizierung molekularer Mechanismen, die zur Apoptoseresistenz bei Rhabdomyosarkomzellen führen, um die Therapieoptionen von Patienten mit Rhabdomyosarkomen zu verbessern.

Einen Ansatzpunkt bietet hier die Identifikation von Apoptoseresistenzmechanismen. Dabei könnte das Protein ARC, wie in anderen malignen Tumoren auch, durch zellschützende antiapoptotische Effekte zur Chemo- sowie Strahlentherapeutikaresistenz in Rhabdomyosarkomzellen beitragen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht daher das antiapoptotische Protein ARC, dessen starke Expression in humanen Rhabdomyosarkomzellen durch unsere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen wurde (persönliche Kommunikation mit Dr. rer. nat. Sarah Funke). Da bis dato noch keine publizierten Daten zu ARC in Rhabdomyosarkomen existieren, sollen folgende Fragestellungen am Rhabdomyosarkom als einem Beispiel für mesenchymale Tumoren beleuchtet werden:

1. Welche Rolle spielt ARC bei der intrinsischen Apoptose im embryonalen Rhabdomyosarkom und welche Bedeutung haben dabei die Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder?

Zur Charakterisierung von ARC wird seine Expression in der adhärenten humanen Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 (embryonaler Subtyp) mit zwei viralen shRNA-Plasmiden (*small hairpin ribonucleic acid*) dauerhaft herabgesetzt und hiernach das Wachstumsverhalten der Zellen mittels eines Proliferationsassays untersucht.

Die Sensitivität der Rhabdomyosarkomzellen gegenüber dem Bcl-2-Antagonisten ABT-263 wird durch Zellzählung eruiert und die ABT-263-vermittelte Induktion der Enzymaktivität für die Caspasen-9, -8 und -3 durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich wird die Spaltung des PARP-Proteins (Poly ADP-ribose Polymerase) als Zeichen stattfindender Apoptose im Western Blot analysiert. Um einen möglichen Effekt von ARC bei der intrinsischen Apoptose zu untersuchen, werden alle Ergebnisse sowohl in nativen, untransduzierten Rhabdomyosarkomzellen als auch in den mit einem ARC-*Knock-down* erhoben. Als Kontrolle dienen die mit *non-silencing* shRNA transduzierten TE-671-Zellen.

Die Expression der wichtigsten pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie wird mittels Western Blot detektiert.

2. Welchen Effekt hat ARC auf die Apoptoseresistenz embryonaler Rhabdomyosarkomzellen gegenüber extrinsischen Stimuli?

Als Induktor extrinsischer Apoptose wird der rekombinant hergestellte Todesligand TRAIL eingesetzt. Die Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 in der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 wird mittels Western Blot untersucht. Anschließend wird die Sensitivität der Rhabdomyosarkomzellen gegenüber TRAIL mittels Zellzählung bestimmt und die PARP-Spaltung zum Apoptosenachweis im Western Blot detektiert. Analog zu den Versuchen zum intrinsischen Apoptosesignalweg werden die TRAIL-Versuche in untransduzierten und in ARC-*Knock-down*-Zellen durchgeführt. Damit soll der Einfluss der ARC-Proteinexpression auf das Überleben der Rhabdomyosarkomzellen nach extrinsischer Apoptoseinduktion überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Laborgerät	Firma
Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systec (Linden)
Brutschrank	Forma scientific, Thermo Fisher Scientific (USA)
Durchflusszytometer CyFlow space	Sysmex, ehem. Partec (Norderstedt)
ELISA-Reader; Modell 680	BioRad (USA)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubationsschüttler RM5	CAT Zipperer (Ballrechten-Dottingen)
Inkubationsschüttler 3033	GFL (Burgwedel)
Kühlschränke	Liebherr (Schweiz)
Laser Scanning Mikroskop 510	Zeiss (Oberkochen)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach)
Mikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar)
Neubauer-Zählkammer	LO – Laboroptik (England)
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (USA)
pH-Meter	HANNA instruments (USA)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Schweiz)
Scepter Cell Counter	Merck Millipore (USA)
Sterilbank Typ DLF/BSS6	Schrader (Göttingen)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	Fischer & Rintelen (Essen)
Western-Blot-Anlage	BioRad, Hoefer (USA)
Zentrifuge Biofuge 13R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Minispin plus	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik (Edermünde)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon-Gefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Glaspipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Nitrilhandschuhe	Ansell (Belgien)
Nitrozellulosemembran	Whatman (Dassel)
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik (Edermünde)
Parafilm	American National Can Company (USA)
Pipettenspitzen	Starlab (Hamburg)
Plastikküvetten	Eppendorf (Hamburg)
Plastikpipetten	Corning (USA)
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter	Sartorius AG (Göttingen)
Whatman Papier	Whatman GmbH (Dassel)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturschaber	Techno Plastic Products (Schweiz)
Zellkulturschalen	Techno Plastic Products (Schweiz)
Zellkulturplatten (6-Well, 96-Well)	Techno Plastic Products (Schweiz)

2.1.3 Chemikalien

Produkt	Firma
Ammoniumpersulfat	Braun (Melsungen)
Arginin	Honeywell Fluka (USA)
Asparagin	Serva (Heidelberg)
Blotting Grade Blocker (*non-fat dry milk*)	BioRad (USA)
Bovines Serum Albumin	Paa Laboratories (Cölbe)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (USA)
DMEM	Thermo Fisher Scientific (USA)

DualColor™ Protein Loading Buffer	Thermo Fisher Scientific, ehem. Fermentas (USA)
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich (USA)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe)
EDTA 1%	Biochrom AG (Berlin)
Ethanol 70%	Merck (Darmstadt)
Fetal Calf Serum	Sigma-Aldrich (USA)
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin >99%	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES 1M	Thermo Fisher Scientific (USA)
IS Mounting Medium DAPI	Dianova (Hamburg)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin 200 mM	Thermo Fisher Scientific (USA)
Methanol pro analysis	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (USA)
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich (USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (USA)
Protease-Inhibitor Complete EDTAfree Tablette	Roche Diagnostics (Schweiz)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad (USA)
Protein Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific, ehem. Fermentas (USA)
Puromycin Dihydrochlorid	Thermo Fisher Scientific (USA)
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS ultra pure >99%	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED	BioRad (USA)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich (USA)
Trizma base 99%	Sigma-Aldrich (USA)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Trypanblau 0,2%	Sigma-Aldrich (USA)
Trypsin 10x Lösung	Thermo Fisher Scientific (USA)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Vectashield mounting medium	Biozol (Eching)

2.1.4 Lösungen und Puffer

Name	Einwaage/Molarität
Blockinglösung Western Blot	5% (w/v) fettfreies Milchpulver 0,1% (v/v) Tween-20 In 1xTBS
Blockinglösung Immunfluoreszenz	10% (v/v) Normal Goat Serum 0,1% (v/v) Triton X-100 In PBS
DAPI-Lösung	1 µg DAPI in 1ml PBS
Elektrophoresepuffer (10x)	20 g SDS 60 g Tris 288 g Glycin Ad 2 L Aqua dest.
Formaldehydlösung	3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS
Ponceau-S-Lösung	0,5 g Ponceau 1 ml Eisessig Ad 100 ml Aqua dest.
Primary Antibody Dilution Buffer	5% (w/v) BSA 0,1% (v/v) Tween-20 In 1xTBS
TBS/T-Waschpuffer (10x)	0,1 M Tris/HCl; pH 7,6 0,15 M NaCl 0,2% Tween-20
Transferpuffer	0,025 mM Tris/HCl; pH 8,5 0,2 M Glycin 20% (v/v) Methanol Ad 2 L Aqua dest.

Zelllysepuffer	30 mM Tris/HCl; pH 7,5 150 mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100 10% (v/v) Glycerin 2 ml steriles Aqua dest. mit 1 darin gelöster Protease-Inhibitor Tablette Ad 50 ml Aqua dest.

2.1.5 Zellkultur

Die adhärente humane Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 wurde aus der Kleinhirnbiopsieprobe einer sechsjährigen Patientin mit der Diagnose eines zerebellären Medulloblastoms etabliert (**McAllister** et al., 1977). Ende der Achtzigerjahre wurde die Zugehörigkeit der Zelllinie TE-671 zum Rhabdomyosarkom und die Verwandtschaft zur Zelllinie RD nachgewiesen (**Chen** et al., 1989; **Stratton** et al., 1989). Somit gehört die untersuchte Zelllinie TE-671 aller Wahrscheinlichkeit nach dem embryonalen Subtyp des Rhabdomyosarkoms an (**McAllister** et al., 1969).

Name	**Einwaage/Molarität**
Zellkulturmedium	500 ml DMEM 10% (v/v) FCS 10 mM HEPES pH 7,4 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 72 mg/l Asparagin 200 mg/l Arginin 2 mM L-Glutamin 2 µg/ml Puromycin bei transduzierten Zellen
PBS/EDTA-Lösung	95% (v/v) PBS 5% (v/v) 1% EDTA
Trypsin/EDTA-Lösung	90% (v/v) PBS/EDTA-Lösung 10% (v/v) Trypsin 10x Lösung

2.1.6 Molekularbiologische Kits und Proteingrößenstandard

Kit	Firma
Red-Caspase-9, -8 und -3 Staining Kit	PromoKine Promo Cell GmbH (Heidelberg)

PageRuler Prestained Plus Protein Ladder von Thermo Scientific

2.1.7 Antikörper

Für den Nachweis der proapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder Bak, Bax, Bid, Bim und PUMA wurde das *Pro-Apoptosis Bcl-2 Family Antibody Sampler Kit* mit der Produkt-ID 9942 von Cell Signaling verwendet.

Antigen	Quelle	Produkt-ID	Bezugsquelle	Verwendung	Verdünnung
ARC	Kaninchen	PA1-30681	Thermo Scientific (USA)	WB IF	1: 1000 1: 500
Bak	Kaninchen	6947	Cell signaling (USA)	WB	1: 1000
Bax	Kaninchen	2772	Cell signaling (USA)	WB	1: 1000
Bcl-2	Maus	M0887	Dako (Hamburg)	WB	1: 500
Bcl-xL	Kaninchen	2762	Cell Signaling (USA)	WB	1: 1000
Bid	Kaninchen	2002	Cell Signaling (USA)	WB	1: 1000
Bim	Kaninchen	2819	Cell Signaling (USA)	WB	1: 1000
Bok	Kaninchen	PA5-11387	Thermo Scientific (USA)	WB	1: 500
DR5	Kaninchen	8074	Cell Signaling (USA)	WB	1: 500
DR4	Maus	sc-8411	Santa Cruz (USA)	WB	1:200
Mcl-1	Kaninchen	4572	Cell Signaling (USA)	WB	1: 1000
PARP	Kaninchen	9542	Cell signaling (USA)	WB	1: 1000

PUMA	Kaninchen	4976	Cell signaling (USA)	WB	1: 500
GAPDH	Maus	G8795	Sigma (USA)	WB	1: 4000
α-Tubulin	Maus	T9026	Sigma (USA)	WB	1: 4000

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Primärantikörper. WB: Western Blot. IF: Immunfluoreszenz.

Antikörper	Quelle	Zielspezies	Bezugsquelle	Verwendung	Verdünnung
IRDye® 680RD	Ziege	Maus	LI-COR Biosciences (USA)	WB	1: 10 000
IRDye® 800CW	Ziege	Kaninchen	LI-COR Biosciences (USA)	WB	1: 10 000
AlexaFluor® 594 IgG	Ziege	Kaninchen	Thermo Scientific (USA)	IF	1: 500

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Sekundärantikörper. WB: Western Blot. IF: Immunfluoreszenz.

2.1.8 Apoptosemodulierende Substanzen

Substanz	Bezugsquelle	Produkt-ID	Lösungsmittel	Konzentration
ABT-263	Selleck Chemical (USA)	923564-51-6	DMSO	10 µM
Super*Killer*TRAIL	Enzo Life Sciences (USA)	ALX-201-115-C010	PBS	10 ng/ml; 50 ng/ml; 100 ng/ml

Tabelle 6: Auflistung verwendeter apoptosemodulierender Substanzen. DMSO: Dimethylsulfoxid; PBS: *phosphate-buffered saline*; TRAIL: *Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand.*

ABT-263

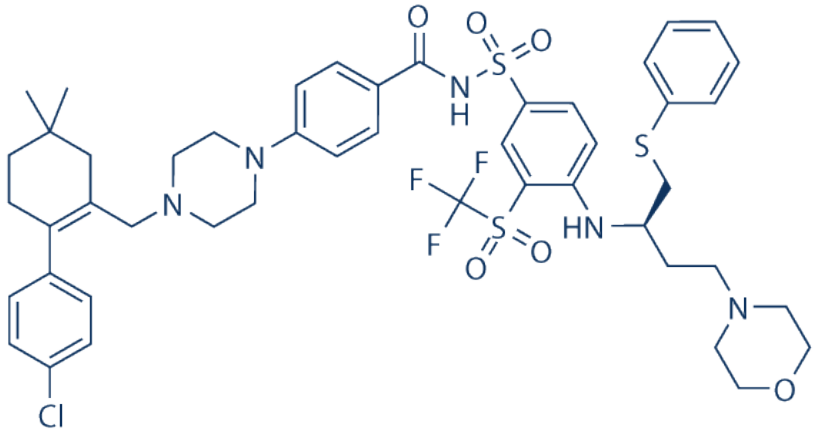


Abb. 5: Strukturformel von ABT-263. Quelle: **WWW.SELLECKCHEM.COM**

Zur Induktion des intrinsischen Signalwegs der Apoptose wurde das BH3-Mimetikum ABT-263 eingesetzt (Abb. 5). Es ist ein oral bioverfügbarer Bcl-2-Proteinfamilieninhibitor mit hoher Bindungsaffinität zu den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w. Durch seine Strukturähnlichkeit zur BH3-Domäne des proapoptotischen Sensitiviererproteins Bad ahmt ABT-263 die Wirkung von Bad nach, indem es die hydrophobe BH3-Bindungsstelle der antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w besetzt und somit blockiert. Es kommt folglich zur Aktivierung von Bax und der Dissoziation des proapoptotischen Effektorproteins Bak vom antiapoptotischen Bcl-xL. Dies führt schließlich zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und der Initiierung von Apoptose. *In vivo* Versuche mit Tumorzellen der lymphatischen Reihe haben gezeigt, dass Bcl-2 als Hauptangriffsziel für ABT-263 dient. ABT-263 wirkt vor allem an den Bcl-2/Bid- und Bcl-2/Bad-Komplexen (**ARANOVICH** et al., 2012; **MÉRINO** et al., 2012). Zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern Mcl-1 und A1 besitzt ABT-263 hingegen eine relativ geringe Bindungsaffinität. Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass eine Überexpression von Mcl-1 mit hoher Resistenz gegenüber ABT-263 oder seiner Vorgängersubstanz ABT-737 korreliert (**TSE** et al., 2008, **OLTERSDORF** et al., 2005, **VAN DELFT** et al., 2006, **CERTO** et al., 2006).

Studien haben gezeigt, dass ABT-263 unabhängig von der Bcl-2-Proteinfamilie proapoptotisch wirken kann. Über eine Expressionssteigerung des C/EBP *homologous*

Proteins (CHOP) initiiert ABT-263 ER-Stress in oralen Karzinomzellen *in vitro* und in Mausversuchen (**YANG** et al., 2019).

TRAIL

Das verwendete Super*Killer*TRAIL (skTRAIL) ist ein Derivat des natürlich vorkommenden Todesliganden *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), welches ein potenter Induktor des extrinsischen Apoptosesignalwegs ist (**WILEY** et al., 1995, **PITTI** et al., 1996). Es enthält ein *Killer*™-Verbindungspeptid, das durch zusätzliche Disulfidbrückenbindungen zu Quervernetzungen im skTRAIL führt und dieses zu einem stabileren Oligomer macht. Dadurch entfällt die Notwendigkeit der Zugabe eines Quervernetzungs-*Enhancers* bei den Versuchsreihen mit dem bereits oligomerisierten skTRAIL. Der Ligand skTRAIL bindet sowohl an den Todesrezeptor DR4 als auch an DR5 (**ENZO SCIENTIFIC**, Stand 18.12.2022, **BEYRATH** et al., 2016; **JANE** et al., 2011).

2.1.9 Software und Server

Software

BioRad Microplate Manager™ Software; Version 5.2

FloMax, Version 1

GraphPad Prism; Version 6

Microsoft Excel, Picture Manager, PowerPoint, Word; 2007/2010

Odyssey Infrared Imaging System 2400; Version 2.1

Zeiss ZEN; 2011

Server

PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Lentivirale Transduktion

Um den Einfluss von ARC in der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 zu untersuchen, wurden die Zellen im Vorfeld der Arbeit mit Hilfe von 45 µg Polyethylenimin mit den Plasmiden pGIPZ ARC-shRNA (*small hairpin ribonucleic acid*) 1365 und 1542 (5 µg) stabil transduziert. Außerdem wurde hierbei das HIV1-Helferplasmid pCD/NL-BH (5 µg) zur Expression der viralen Proteine *gag*, *pol* und *rev* (pCD/NL-BH) sowie der Hüllvektor pczVSV-G (5 µg) in die Zellen eingebracht (**ZHANG** et al., 2004, **PIETSCHMANN** et al., 1999). Die verwendeten Plasmide wurden von der Firma Thermo Scientific bezogen. Zur Kontrolle des Einflusses des Transduktionsvorgangs auf das Verhalten der Zellen diente das pGIPZ *non-silencing* shRNA-Plasmid, das außer einer Puromycinresistenz und der Expression von turboGFP (*green fluorescent protein*) keine Wirkung auf die Genexpression, insbesondere die von ARC, entfalten sollte. Zur Selektion der transduzierten Zellen wurde das Antibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 2 µg/ml zum Zellkulturmedium hinzugegeben. Das ebenfalls durch die pGIPZ Vektoren codierte Protein turboGFP ermöglichte durch seine grüne Eigenfluoreszenz eine visuelle Kontrolle des Transduktionserfolgs in der Fluoreszenzmikroskopie und konnte während durchflusszytometrischer Messungen zusätzlich zur Selektion transduzierter Zellen verwendet werden.

2.2.1.2 Kultivierung der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671

Zur Durchführung der geplanten Versuchsreihen wurden die adhärenten TE-671-Zellen im Brutschrank bei einer konstant gehaltenen Atmosphäre von 5% Kohlenstoffdioxid, einer Temperatur 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Um eine dichteabhängige Proliferationshemmung zu verhindern und die Heterogenität der Zellen zu erhalten, wurden diese konstant in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Dazu wurden sie nach Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz passagiert. Das bereits verbrauchte Zellkulturmedium mit den abgesonderten Stoffwechselprodukten und abgestorbenen Zellen wurde entfernt und durch frisches Medium mit darin enthaltenen neuen Nährstoffen ersetzt.

Hierzu wurde das in der Zellkulturflasche befindliche alte Medium abgenommen und die adhärenten Zellen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Somit wurde das restliche Zellmedium samt der darin befindlichen Abbauprodukte und des

proteinreichen FCS (*fetal calf serum*) entfernt. Letzteres besitzt die Eigenschaft, die zur Ablösung der Zellen eingesetzte Trypsinisierung zu verhindern. Diese wurde anschließend durch Zugabe einer Trypsin-/EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraacetat) durchgeführt. Hierbei spaltet die Serinprotease Trypsin Peptidbindungen der behandelten Zellen an der Oberfläche, die ihnen zur Verankerung am Boden des Kulturgefäßes und auch untereinander im Zellverband dienen. Der Chelatbildner EDTA bindet bevorzugt zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+}, die für Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Bindungen benötigt werden und unterstützt somit den Vorgang der Zellablösung. Nach 5 Minuten wurde der Vorgang durch Zugabe von gleichem Volumenanteil an Zellmedium abgebrochen und die Zellen resuspendiert. Schließlich wurde ein dem Splittingverhältnis entsprechender Anteil der Zellen in eine neue, saubere Zellkulturflasche überführt.
Da im Vorfeld der Arbeit eine lentivirale Transduktion der Zellen durchgeführt wurde, ergaben sich daraus drei Varianten der eingesetzten Zelllinie TE-671. Zum einen wurden die mit *non-silencing*-shRNA und die mit ARC-shRNA transduzierten Zellpopulationen in separaten Zellkulturflaschen kultiviert. Zum anderen erhielten diese beiden Zellgruppen ein mit Puromycin versetztes Zellkulturmedium, gegen das sie resistent waren und das der Selektion der transduzierten von den untransduzierten Zellen diente. Die Puromycinresistenz war zusammen mit dem turboGFP-Signal auf dem eingebrachten Vektor codiert. Die untransduzierte Zellvariante wurde ebenfalls separat kultiviert. Das hier eingesetzte Medium enthielt folglich kein Puromycin, da die Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 keine nachgewiesene Puromycinresistenz besitzt. Bei allen Versuchen wurde darauf geachtet, dass die Puromycinselektion stets eingehalten wurde.

2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und Zählpipette

Neubauer-Zählkammer

Zunächst wurden die adhärent wachsenden TE-671-Zellen wie unter 2.2.1.2. beschrieben vom jeweiligen Gefäßboden abgelöst und ein Teil von ihnen nach Resuspension in einem bestimmten Verhältnis mit Trypanblau-Lösung (0,2% in PBS) versetzt. Die so entstandene Zellsuspension wurde auf die Neubauer-Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Die Auswertung der Anzahl vitaler Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Der Farbstoff Trypanblau vermag die Zellmembran stark geschädigter und toter Zellen zu durchdringen und diese blau anzufärben. Demzufolge wurden ausschließlich farblose Zellen als vital angesehen und in allen acht Großquadraten der Zählkammer ausgezählt. Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgte nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{Zellzahl}{ml} = \frac{(x \times y)}{8} \times 10^4$$

x: Anzahl gezählter Zellen in 8 Großquadraten

y: Verdünnungsfaktor

10^4: Kammerfaktor

Zählpipette

Die Zellzahlbestimmung durch die Scepter Cell Counter-Pipette von Merck beruht auf dem Prinzip der impedanzgestützten Zelldetektion. Zu untersuchende Zellen wurden wie unter 2.2.1.2. resuspendiert und gegebenenfalls zur besseren Handhabung in ein Falcon-Gefäß überführt. Die Pipette wurde in die Zellsuspension gehalten, wobei der Sensor ein vordefiniertes Volumen von 60 µl aufgenommen hat. Beim Vorbeifließen der Zellen am Pipettensensor erzeugen diese eine Widerstandserhöhung im Gerät, welche gemäß Ohm'schem Gesetz:

$$U = R \times I$$

U: Spannung

R: Widerstand

I: Stromstärke

in eine Spannung umgewandelt und aufgezeichnet wird. Aus der Widerstands- und Spannungsänderung errechnet das Gerät die Zellzahl für die ausgewählte Zellpopulation. Außer der Zellzahl bestimmt die Pipette ebenfalls die Größe der durchfließenden Partikel und bildet diese in einem Histogramm ab. Hier kann durch Setzen von *Gates* die Zellzahl der vitalen Zellpopulation separat bestimmt werden.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels ELISA-Reader

Das kolorimetrische MTT-*Assay* dient der quantitativen Beurteilung von Zellproliferation und -aktivität (**MOSMANN**, 1983). Es basiert auf der Fähigkeit mitochondrialer Enzyme vitaler Zellen, das ursprünglich goldfarbene MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)-Bromid zu einem lilafarbenen Formazansalz, das in Kristallen ausfällt, zu reduzieren. Zur Durchführung des *Assays* wurde das MTT in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS gelöst und die Stocklösung lichtgeschützt aufbewahrt.

Das MTT-*Assay* wurde dazu verwendet, um eine Proliferationskinetik der unter 2.2.1.1. aufgeführten Zellgruppen der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 anzufertigen. Diese diente zum einen der Bestimmung der exponentiellen Wachstumsphase der entsprechenden Zellen und zum anderen sollte gezeigt werden, ob ein *Knock-down* von ARC oder das alleinige Einbringen eines viralen Vektors in die Zellen einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der jeweiligen Zellgruppe hatte. Hierzu wurden 3 x 10^3 Zellen in 200 µl Kulturmedium pro *Well* in 96-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank bis zum Erreichen einer Zelladhärenz am Gefäßboden inkubiert. An Tag 0 bis 7 nach der Aussaat wurde die entsprechende Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurden in jedes zu messende *Well* 50 µl der MTT-Lösung gegeben und die Zellen für 2 Stunden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurde das Medium samt MTT entfernt und die Zellen mit 100 µl DMSO pro *Well* versetzt, um die gebildeten Kristalle zu lösen. Dies erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht. Die Absorptionsmessung wurde anschließend bei einer Testwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm durchgeführt (ELISA-Reader 680; BioRad). Die dabei gemessene optische Dichte war während der linearen Wachstumsphase direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen und konnte nach Erstellung einer Kalibrierungskurve errechnet werden. Hierzu wurden Zellen der drei Zellpopulationen in einer aufsteigenden Konzentration von 2000 bis 36000 Zellen/*Well* in 2000-er Schritten ausgesät und wie oben für 2 Stunden mit MTT im Brutschrank inkubiert. Nach der Messung der entsprechenden optischen Dichte konnte für jede Zellgruppe eine Kalibrierungskurve angefertigt werden, die jeder Zellzahl einen entsprechenden Absorptionswert zugeordnet hat. In den linearen Abschnitt dieser Kurve wurde eine Ausgleichsgerade gelegt und ihre Geradengleichung bestimmt. So ergab sich für die untransduzierte, die *non-silencing*- und die ARC-*Knock-down*-Zellpopulation jeweils eine Formel, mit der der gemessene Absorptionswert in eine Zellzahl umgerechnet werden konnte.

Diese Formel diente unter anderem dazu, anhand der ermittelten Wachstumskurven (Anhang, Abb. 20) die Verdopplungszeit der jeweiligen Zellpopulationen zu berechnen. Hierzu wurde nach Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase analog zur

Kalibrierungskurve eine Ausgleichsgerade in den linearen Bereich der Wachstumskurve gelegt und ihre Geradengleichung aufgestellt. Für die ARC-*Knock-down*-Zellgruppe lautete diese:

$$y = 56629 \times x - 32713; R^2 = 0,9924$$

und für die transduzierte *non-silencing*-Kontrollzellgruppe:

$$y = 77195 \times x - 41210;\ R^2 = 0,9881.$$

Das Bestimmtheitsmaß R^2 stellt dabei einen Parameter für die Güte der linearen Regressionsgeraden dar. Ein R^2 = 0 bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen *x* und *y* besteht. Ein R^2 nahe dem Wert „1“ beschreibt einen starken linearen Zusammenhang zwischen den Variablen *x* und *y*. Anhand dieser Gleichungen wurden die Verdopplungszeiten anschließend mittels mathematischer Umformungen ermittelt.

2.2.1.5 Behandlung mit apoptosemodulierenden Substanzen

Zur Induktion von Apoptose mit apoptosemodulierenden Substanzen wurden die Zellen in Abhängigkeit vom durchgeführten Versuch in Zellkulturschalen, -flaschen oder Transwellplatten in einer Dichte von 1-3 x 10^4 Zellen/cm^2 ausgesät und für mindestens 12 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Vor Beginn der Behandlung wurde das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und anschließend ein frisches Medium, welches die entsprechend eingesetzte Substanz enthielt, auf den Zellrasen gegeben. Zur Kontrolle diente das Lösungsmittel der entsprechenden apoptosemodulierenden Substanz, das in identischer Konzentration in Medium gelöst und auf die Zellen pipettiert wurde. Nach der erforderlichen Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Lebendzellzahl wie unter 2.2.1.3. beschrieben bestimmt oder weitere Versuche durchgeführt. Für jede Zellpopulation wurde eine separate Kontrollbehandlung angesetzt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Nachweis von Caspaseaktivität mittels Durchflusszytometrie

Caspasen sind die zentralen Akteure im komplexen Gefüge des programmierten Zelltodes. Ihr Aktivitätsmuster spiegelt somit die proapoptotische Wirkung der eingesetzten apoptosemodulierenden Substanzen in der Zelle wider. Zur Messung der jeweiligen Caspaseaktivität wurden fluoreszenzbasierte *Kits* verwendet und das farbliche Signal anschließend im Durchflusszytometer registriert. Die im *Kit* enthaltenen Caspaseinhibitoren Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK und Z-DEVD-FMK vermögen in lebende Zellen einzudringen und hier spezifisch das aktive Zentrum der jeweiligen aktivierten Caspase-8, -9 oder -3 durch ihre zusätzliche Fluoromethylketongruppe (FMK) irreversibel zu binden. Dabei bestehen die Inhibitoren aus einem Tetrapeptid, dessen Aminosäuresequenz komplementär zu einem Abschnitt im aktiven Zentrum der zu hemmenden Caspase ist. Sie dienen somit als Substrat für die aktiven Caspasen, die sie irreversibel binden. Inaktive Caspasen werden nicht gebunden, da diese erst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden und einen Konformationswechsel vollziehen müssen. Um die beschriebene Reaktion sicht- und messbar zu machen, sind die Caspaseinhibitoren an den roten Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin gekoppelt, dessen Aktivität durchflusszytometrisch quantifiziert werden kann. Das rote Signal wurde im FL2-Kanal bei einer Extinktionswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 nm quantifiziert. Im FL1-Kanal wurde hingegen das grüne Signal mit einer Wellenlänge von 525 nm abgebildet. Dieses wurde zum größten Teil von den transduzierten Zellen generiert, deren pGIPZ-Transduktionsvektor eine Sequenz zur Codierung des grünen Fluorochroms turboGFP enthält. Die untransduzierten Zellen wiesen zudem eine geringe grüne Eigenfluoreszenz auf.

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine genaue Untersuchung von Zellen anhand ihrer emittierten Fluoreszenzsignale. Dabei werden die in Suspension gebrachten Zellen in einem Strahl einzeln an Lasern vorbeigeführt. Mit einer den Lasern eigenen Extinktionswellenlänge regen diese die zellgebundenen Fluorochrome an und es erfolgt ein Übergang auf ein höheres Energieniveau. Bei der Rückkehr von angeregtem in das Ruheenergiestadium emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe energieärmeres Licht einer höheren Wellenlänge (Fluoreszenz). Detektoren nehmen die ausgesandten Lichtstrahlen auf, welche anschließend in Intensitätssignale umgewandelt werden (**BONNER** et al., 1972). Zur weiteren Analyse werden die gemessenen Lichtintensitäten in Datenwolken (*Dot-Plots*) dargestellt (Anhang, Abb. 23).

Für die oben beschriebenen Messungen wurden die drei unter 2.2.1.1 generierten Zellgruppen der Zelllinie TE-671 in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm^2 in T-25-Zellkulturflaschen ausgesät und für mindestens 12 Stunden im Brutschrank unter

Standardbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit ABT-263 wie unter 2.2.1.5. beschrieben. Als Kontrolle dienten mit DMSO (0,5%) behandelte Zellen. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellvitalität wurde das Zellmedium jeweils in ein 15-ml-Falcon überführt. Der Zellrasen wurde mit 2 ml PBS gewaschen und das verwendete PBS ebenfalls in das Auffanggefäß mit dem bereits enthaltenen Nährmedium gegeben. Ins Auffanggefäß wurden anschließend die abgelösten und resuspendierten Zellen gegeben. Es erfolgte eine Pelletierung der Zellen bei 30 g und 20°C für 3 Minuten. Für die anschließende Reaktion wurde die folgende Lösung lichtgeschützt vorbereitet:

master-Mix Caspase Assay	12 µl Zellkulturmedium/cm^2
	0,04 µl Caspase-3, -8 oder -9 Inhibitor/cm^2

Jedes Zellpellet wurde in 300 µl des *master*-Mixes resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Als Negativkontrolle diente eine mit Kulturmedium versetzte Zellprobe, welche jedoch kein Caspasesubstrat enthielt. Die Zellen wurden für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend bei 27 g und 20°C für 3 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde zweimal mit jeweils 500 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend in 800 µl Waschpuffer aufgenommen. Schließlich konnten die Proben auf Eis und gegen Licht geschützt der Durchflusszytometrie zugeführt werden. Als Kontrolle der Substanzwirkung dienten mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen der entsprechenden Zellgruppe.

2.2.2.2 Isolation von Proteinen aus der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671

Die in Zellkulturflaschen ausgesäten Zellen wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben abgelöst und in ein 15-ml-Falcon überführt. Gemeinsam mit dem Zellkulturmedium und den zuvor verwendeten Reagenzien PBS sowie Trypsin/EDTA wurde die Zellsuspension für 4 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in Abhängigkeit der erwarteten Proteinkonzentration in 50-100 µl Proteinlysepuffer aufgenommen und mittels Vibration durchmischt. In Zellkulturplatten erfolgte das Ablösen der Zellen unter Verwendung eines speziellen Zellschabers und 300 µl Proteinlysepuffer.
Für 20 Minuten wurde die Zellsuspension im Eisbad inkubiert, wobei sie zwischenzeitlich auf dem Vortex-Mixer durchmischt wurde. Dieser Schritt diente dazu, die Zellmembranen

mit dem verwendeten Puffer aufzuschließen und die in den Zellen enthaltenen Proteine freizusetzen. Anschließend wurden die Proben bei 14000 g und einer Temperatur von 4°C für 20 Minuten zentrifugiert, um die in Lösung befindlichen Proteine von den übrigen Zellbestandteilen zu separieren. Der proteinreiche Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Proteinlysepuffer	50 mM Tris/HCl; pH 7,4
	1% (v/v) Triton X-100
	0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat
	1 Tablette Protease-Inhibitor
	150 mM NaCl
	Ad 50 ml Aqua dest.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im zuvor gewonnenen Zelllysat erfolgte unter Verwendung der kalorimetrischen Methode nach **BRADFORD** aus dem Jahr 1976. Sie basiert auf der Beobachtung, dass der verwendete Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G-250 bei Bindung an Proteine einen Umschlag seines Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm vollzieht, welcher photometrisch detektiert werden kann. Der Wechsel von der kationischen zur anionischen Form wird durch eine Farbänderung von rot zu blau sichtbar. Unter Einwirkung von Van-der-Waals-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen lagert sich die anionische Form des Farbstoffs an Argininggruppen der zu untersuchenden Proteine an (**COMPTON UND JONES**, 1985). Um die Konzentration der gewonnenen Proteine zu bestimmen, wurde 1 µl der zu untersuchenden Probe mit dem 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz in einer Messküvette auf 1 ml aufgefüllt. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer. Da die Höhe der Absorption bei 595 nm direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, wurde eine Kalibrierungskurve mit Rinderserumalbumin (BSA) in aufsteigender Konzentration von 1-10 µg BSA angefertigt und ihre Geradengleichung bestimmt. Anhand dieser konnte nun eine Umrechnung der ermittelten Absorptionswerte in die entsprechende Proteinkonzentration vorgenommen werden. Zur Kontrolle der Messungen diente stets eine Küvette mit 1 ml Bradford-Reagenz ohne Protein.

2.2.2.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um das gewonnene Proteingemisch anhand der einzelnen Proteingrößen aufzutrennen, wurde die von Lämmli etablierte Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE angewendet (**LAEMMLI**, 1970). Zuvor wurden die Proteinproben zur Denaturierung ihrer Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur mit 1 µl Reduktionsvermittler versetzt, der intra- und intermolekulare Disulfidbrückenbindungen aufzubrechen vermag, und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Als Auftrennungsmedium wurde Polyacrylamidgel verwendet. Die Polymerisation des Acrylamids erfolgte unter Verwendung von Ammoniumpersulfat, dessen freie Radikale die Reaktion initiierten. Als Katalysator fungierte hierbei TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin). Das aus einem großporigen Sammel- und einem feinporigen Trenngel bestehende vertikale System wurde mit 50 µg Protein pro Tasche beladen und an Strom (20-40 mA pro Gel) angeschlossen. Beim Durchlaufen des Gels entlang des elektrischen Feldes binden die Proteine das anionische Detergens SDS unter Bildung von negativ geladenen Protein-SDS-Komplexen mit konstantem Masse-Ladungs-Verhältnis. So wird eine Auftrennung der denaturierten Proteine anhand ihres Molekulargewichts und unabhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz oder Eigenladung ermöglicht. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Abhängig von dieser wurden die zu untersuchenden Proteine in 8, 12 oder 15%igen Trenngelen unter Verwendung von einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer separiert.

<u>Sammelgel</u>	68,9% H_2O
	16,5% (v/v) Acrylamid-Mix
	1% (v/v) 10% Ammoniumpersulfat
	1% (v/v) 10% Natriumdodecylsulfat
	12,5% (v/v) 1,0 M Tris pH 6,8
	0,1% (v/v) Tetramethylethylenediamin
<u>8%iges Trenngel</u>	45,4% H_2O
	27% (v/v) Acrylamid-Mix
	1% (v/v) 10% Ammoniumpersulfat
	1% (v/v) 10% Natriumdodecylsulfat
	25% (v/v) 1,5 M Tris pH 8,8
	0,6% (v/v) Tetramethylethylenediamin
<u>12%iges Trenngel</u>	33% H_2O
	40% (v/v) Acrylamid-Mix
	1% (v/v) ml 10% Ammoniumpersulfat

	1% (v/v) 10% Natirumdodecylsulfat
	25% (v/v) 1,5 M Tris pH 8,8
	0,06% (v/v) Tetramethylethylenediamin
<u>15%iges Trenngel</u>	23% H_2O
	50% (v/v) Acrylamid-Mix
	1% (v/v) ml 10% Ammoniumpersulfat
	1% (v/v) 10% Natriumdodecylsulfat
	25% (v/v) 1,5 M Tris pH 8,8
	0,06% (v/v) Tetramethylethylenediamin

2.2.2.5 Proteintransfer „Western Blot“

Um die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine immunologisch analysieren zu können, mussten diese auf ein geeignetes Medium, eine Nitrozellulosemembran, transferiert werden (**TOWBIN** et al., 1979). Hierzu wurde sowohl der *wet blot* als auch die *semi-dry*-Methode verwendet.

Die dem *wet blot* dienende Transferkammer wurde mit Transferpuffer befüllt und die Transferkassette darin eingesetzt. Die aus zwei Gittern bestehende Kassette wurde zuvor aufgeklappt und wie folgt aufgebaut: Auf der der Anode zugewandten Seite wurde ein spezieller Schwamm ausgelegt und von einem passend dafür zurechtgeschnittenen Whatman-Papier bedeckt. Anschließend wurde die der Größe des Polyacrylamidgels entsprechende Nitrozellulosemembran auf dem Whatman-Papier platziert, gefolgt vom Polyacrylamidgel von der Gelelektorphorese sowie einer weiteren Lage des Whatman-Papiers. Zum Abschluss wurden die Schichten von einem weiteren Schwamm bedeckt und die Transferkassette verschlossen. Alle Bestandteile der Kassette wurden zuvor mit Transferpuffer benetzt. Es wurde beim Aufbau darauf geachtet, keine Luftblasen entstehen zu lassen. Schließlich wurde das *blotting* bei 90 V für 90 Minuten oder bei 30 V über Nacht unter ständiger Kühlung der Transferkammer durchgeführt. Die negativ geladenen Proteine treten nach Anlage von elektrischer Spannung gemäß dem Ohm’schen Gesetz aus dem Gel und wandern dabei in Richtung der positiv geladenen Anode auf die Nitrozellulosemembran (**TOWBIN** et al., 1979).

Bei der Methode des *semi-dry blotting* wird ebenfalls das Prinzip der elektrisch gesteuerten Übertragung von Proteinen aus dem Gel auf die Membran verwendet. Ein „Sandwich“ aus jeweils fünf in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren auf der Anode- und der Kathodeseite, dem Polyacrylamidgel mit den darin enthaltenen Proteinen sowie der Nitrozellulosemembran wurde zwischen zwei Platin/Edelstahl-Plattenelektroden

angebracht (**KYHSE-ANDERSEN**, 1984). Bei einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA pro cm^2 der Geloberfläche wurden die Proteine für 60 Minuten *geblottet* (übertragen).

2.2.2.6 Proteinfärbung nach Ponceaurotfärbung

Die mittels Western Blot auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteinbanden wurden zur Überprüfung des Transfererfolgs mithilfe der Ponceau-S-Lösung visualisiert. Der anionische Ponceau-S-Farbstoff geht reversible Bindungen mit Proteinen ein, ohne dabei die anschließende Immundetektion zu beeinträchtigen (**GRACIA UND FERNANDEZ-BELDA**, 1992). Die zu untersuchende Membran wurde zwecks Färbung für 10 Minuten mit der Ponceau-S-Lösung bedeckt und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff abgegossen und die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen. Die sich so deutlich abzeichnenden Proteinbanden wurden mit einer Fotokamera aufgenommen. Für weitere Untersuchungen wurde die Membran mittels TBS (*tris-buffered saline*) entfärbt.

2.2.2.7 Immunfärbung und -detektion

Im letzten und entscheidenden Schritt wurden die zuvor aufgetrennten und übertragenen Proteingemische unter Einsatz von Antikörpern auf das Vorhandensein von bestimmten Zielproteinen hin untersucht. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die restlichen freien Proteinbindungsstellen zuvor abgesättigt. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran bei Raumtemperatur für eine Stunde in Blockinglösung geschwenkt. Anschließend erfolgte der Einsatz des entsprechend gelösten Primärantikörpers, der sich gegen eine definierte Aminosäuresequenz im gesuchten Zielprotein richtet. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die ungebundenen Primärantikörper wurden anschließend abgegossen und nochmals in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten à 10 Minuten mit TBS entfernt. Zur Detektion der vom Primärantikörper gebundenen Zielproteine wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt. Dieser reagiert spezifisch auf diejenige Tierspezies, in der der Primärantikörper hergestellt wurde, und bindet diesen selektiv an mehreren Bindungsstellen. Unter Ausschluss von Licht wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem entsprechend gelösten Sekundärantikörper inkubiert und danach wieder dreimal mit TBS gewaschen. Schließlich erfolgte mithilfe des *Odyssey Infrared Imaging* Systems die Detektion des Fluoreszenzsignals auf der Nitrozellulosemembran.

Der im eingesetzten Gerät befindliche Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe des Sekundärantikörpers bei einer Wellenlänge von 685 bzw. 785 nm an und erzeugt damit ein rotes bzw. grünes Signal, welches durch einen eingebauten Scanner aufgezeichnet wird. Die Stärke der so erzeugten Proteinbanden kann zusätzlich mit der entsprechenden Gerätesoftware densitometrisch erfasst werden.

2.2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung und Lasermikroskopie

Analog zur Western-Blot-Methode beruht die Immunfluoreszenzmikroskopie auf dem Prinzip der antigenspezifischen Primärantikörper, die das zu untersuchende Protein selektiv binden und anschließend von fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern erkannt werden. Zur Darstellung von Fluoreszenzsignalen werden die Fluorochrome mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und anschließend das längerwellige, energieärmere Emissionslicht detektiert. Die Besonderheit des verwendeten konfokalen Lasermikroskops besteht darin, dass emittierte Lichtsignale unterschiedlicher Wellenlängen in einer ausgewählten räumlichen Ebene gleichzeitig aufgezeichnet werden können. Der Laser „tastet“ die Probe Ebene für Ebene ab und erlaubt so hochaufgelöste 3-D-Abbilder von Protein-Kolokalisationen in fixierten Zellen.

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenzfärbung wurden 9×10^3 Zellen/*Well* auf Deckgläschen in 6-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und ein Waschschritt mit 1 ml PBS durchgeführt. Um die Zellen zu fixieren, wurden diese mit 1 ml einer 3,7%igen Formaldehydlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur benetzt. Auf drei Waschschritte mit PBS folgte eine einstündige Inkubation mit Blockinglösung. Das darin enthaltene nichtionische Detergens Triton X-100 interagiert mit Bestandteilen von Zellmembranen und macht sie durchlässig für Blockingproteine und später eingesetzte Antikörper. Die verwendeten Blockingproteine entstammen dem Serum von Ziegen, welches ebenfalls als Donor für die Sekundärantikörper dient. Analog dem *Blocking* beim Western Blot wird versucht, eine möglichst spezifische Bindung der Zielantigene durch die eingesetzten Antikörper zu erreichen. Dies wird durch den gemeinsamen Ursprung der Substanzen unterstützt. Nach Entfernung der Blockinglösung wurde die Inkubation mit dem Anti-ARC-Primärantikörper durchgeführt. Hierzu wurde dieser in einer Konzentration von 1:500 in Blockinglösung verdünnt und für 1 Minute bei 15 g abzentrifugiert, um eventuell vorhandene Schmutzpartikel abzufangen. 100 µl der Antikörperlösung wurden auf ein Stück Parafilm pipettiert, sodass sich darauf ein Tropfen bildet. Nun wurde das Deckgläschen aus der 6-*Well*-Zellkulturplatte vorsichtig mit einer Pinzette herausgenommen mit den Zellen nach

unten auf den Tropfen gelegt, wobei die Bildung von Luftbläschen vermieden wurde. Die Zellen wurden bei 4°C über Nacht mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Im Anschluss wurden sie dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Die zu verwendenden Sekundärantikörper wurden wie oben in einem Verhältnis von 1:500 gelöst und ebenfalls zentrifugiert. Sie richten sich spezifisch gegen die Spezies, aus der die Primärantikörper stammen. Im Falle von ARC waren dies Kaninchen. Unter Ausschluss von Licht wurden 100 µl der Sekundärantikörperlösung auf ein frisches Parafilmstück pipettiert und die Deckgläschen mit den Zellen daraufgelegt. Bei Raumtemperatur wurden diese für 2 Stunden lichtgeschützt inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol) sichtbar gemacht. DAPI vermag durch die Zellmembranen bis in den Zellkern zu dringen, wo es sich an A/T-reiche Abschnitte der DNA anlagert. Nach Bestrahlung mit UV-Licht sendet DAPI ein blaues Lichtsignal mit einer Emissionswellenlänge von 460 nm aus. Die Zellen wurden mi 1 ml DAPI-Lösung beschichtet und für 1 Minute bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Vectashield gegeben, das ein Ausbleichen der Fluorochrome verhindern sollte, und das Deckgläschen mit den Zellen nach unten daraufgelegt. Um die Proben vor Austrocknung zu bewahren, wurden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack am Objektträger versiegelt. Zur Kontrolle dienten ungefärbte Zellen, die nur mit Blockinglösung inkubiert wurden. In einer weiteren Kontrolle wurden Zellen lediglich mit dem Sekundärantikörper, jedoch nicht mit dem Primärantikörper versetzt, um so mögliche unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers nachzuweisen.

Anschließend wurden die Fluoreszenzsignale mittels konfokaler Lasermikroskopie ermittelt und Schichtaufnahmen angefertigt. Dabei konnte das ARC-Signal in rot bei einer Emissionswellenlänge von 617 nm detektiert werden. Für das in transduzierten Zellen exprimierte turboGFP wurden keine Antikörper verwendet, da das Protein eine ausreichende Eigenfluoreszenz aufweist. Das grüne turboGFP-Signal wurde bei 502 nm aufgezeichnet.

3 Ergebnisse

In Vorarbeiten zur Expression und Funktion des antiapoptotischen Proteins ARC in Tumoren mesenchymalen Ursprungs konnte durch unsere Arbeitsgruppe eine besonders starke ARC-Expression im Rhabdomyosarkom (RMS) gezeigt werden (persönliche Kommunikation mit Dr. rer. nat. Sarah Funke). Im Vergleich mit der epithelialen Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6 zeigte sich ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression von ARC in der RMS-Zelllinie TE-671 (Anhang, Abb. 19). Um die Rolle von ARC im embryonalen RMS nun näher zu untersuchen, wurde seine Expression in der Zelllinie TE-671 herunterreguliert. Dies erfolgte im Vorfeld der Arbeit durch eine stabile Transduktion der Zellen mit lentiviraler shRNA (*small hairpin ribonucleic acid)*. Zur Kontrolle der Transduktion diente die mit dem *non-silencing*-Vektor transduzierte Zelllinie TE-671. Zur Induktion intrinsischer Apoptosesignalwege diente das BH3-Mimetikum ABT-263. Es weist eine hohe Bindungsaffinität zu den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, jedoch nicht zu Mcl-1 auf. Zur Induktion extrinsischer Apoptose wurde ein Derivat des natürlich vorkommenden Todesliganden TRAIL in Form von Super*Killer*TRAIL (skTRAIL) eingesetzt.

3.1 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die Proliferationskinetik der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671

3.1.1 Nachweis des ARC-Knock-downs

Die Effizienz der Transduktion konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 6). Der prozentuale Anteil der Expression von ARC im Vergleich mit der Expression des *housekeeping*-Genprodukts GAPDH (Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase) betrug nach der Transduktion 9,7%. Verglichen mit dem prozentualen Anteil der ARC-Expression von 55,1% in der untransduzierten Zellgruppe, bedeutet dies eine relative Herunterregulation der ARC-Expression um 82,4% in der mit ARC-*Knock-down*-shRNA transduzierten Zellpopulation. Für die mit *non-silencing*-shRNA transduzierten Zellen konnte für ARC eine relative Expression von 50,6% im Vergleich zum *housekeeping*-Gen nachgewiesen werden. Verglichen mit dem ARC/GAPDH-Expressionsverhältnis von 9,7% in den *Knock-down*-Zellen, zeigten die mit dem *non-silencing*-Kontrollvektor transduzierten Zellen relativ eine 5-fach höhere Expression von ARC.

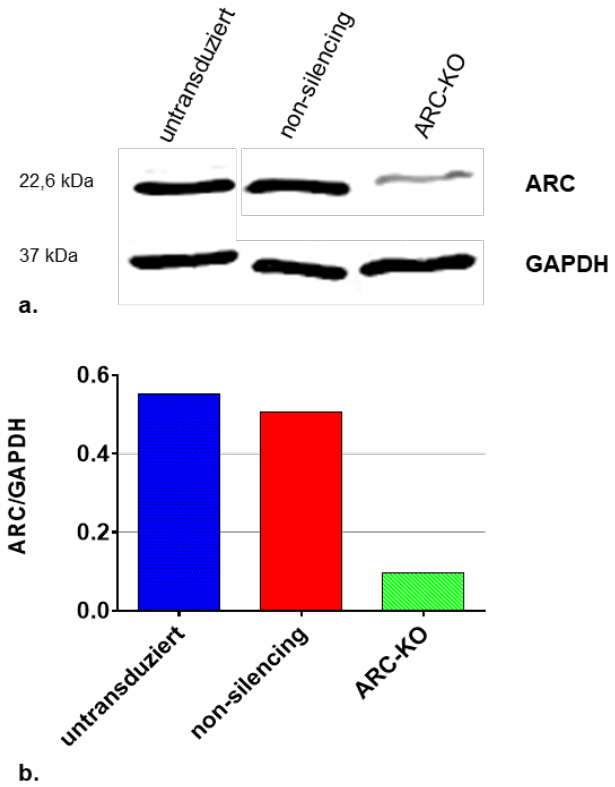


Abb. 6: Nachweis des ARC-Knock-downs in der RMS-Zelllinie TE-671 mittels Western Blot. a. Zur Bestätigung der gleichmäßigen Auftragungsmenge der Proteine wurde GAPDH detektiert. **b.** Das relative Verhältnis von ARC zu GAPDH wurde für das unter **a.** gezeigte Gel graphisch aufgetragen (Werte siehe Anhang, Tabelle 12). Exemplarische Darstellung für drei unabhängig durchgeführte Versuche. ARC-KO: ARC-*Knock-down;* kDa: Kilodalton.

3.1.2 Zelluläre Lokalisation von ARC

Wie unter 1.4.1 beschrieben, existieren für ARC keine einheitlichen Informationen zur subzellulären Lokalisation in verschiedenen Tumorzellen. Da entsprechende Daten zum RMS in der Literatur bislang fehlten, untersuchten wir zunächst die Verteilung von ARC im embryonalen Wildtyp-RMS. Mithilfe fluoreszenzbasierter Lasermikroskopie wurde der Sekundärantikörper gegen den spezifischen anti-ARC-Primärantikörper bei einer Wellenlänge von 617 nm mit einem konfokalen Mikroskop detektiert (rot). Analog wurde die Lokalisation von ARC nach seinem *Knock-down* bestimmt. Zusätzlich wurde bei einer Wellenlänge von 502 nm im grünen Kanal das GFP-Signal der beiden transduzierten Zellpopulationen sowie die Eigenfluoreszenz der untransduzierten Zellgruppe aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt (450 nm, blau).

Die Transduktion der RMS-Zellen mit den ARC-shRNA-Plasmiden führte im Vergleich zu den *non-silencing-* und den untransduzierten Zellen zu einer Expressionsminderung von ARC (Abb. 7). Dieser Effekt ließ sich vor allem im Zellkern der untersuchten Zellen beobachten, während die zytoplasmatische Expression in einem geringeren Maße reduziert erschien. In den ARC-*Knock-down*-Zellen war das rote Fluoreszenzsignal am schwächsten ausgeprägt und führte zur Darstellung sog. „ausgestanzter Zellkerne“. In Einklang mit den unter 3.1.1 erzielten Ergebnissen konnte nach dem *Knock-down* eine geringe Restexpression von ARC in den RMS-Zellen detektiert werden. Die Lokalisation des verbliebenen ARC-Anteils wurde hier überwiegend im Zytoplasma detektiert.

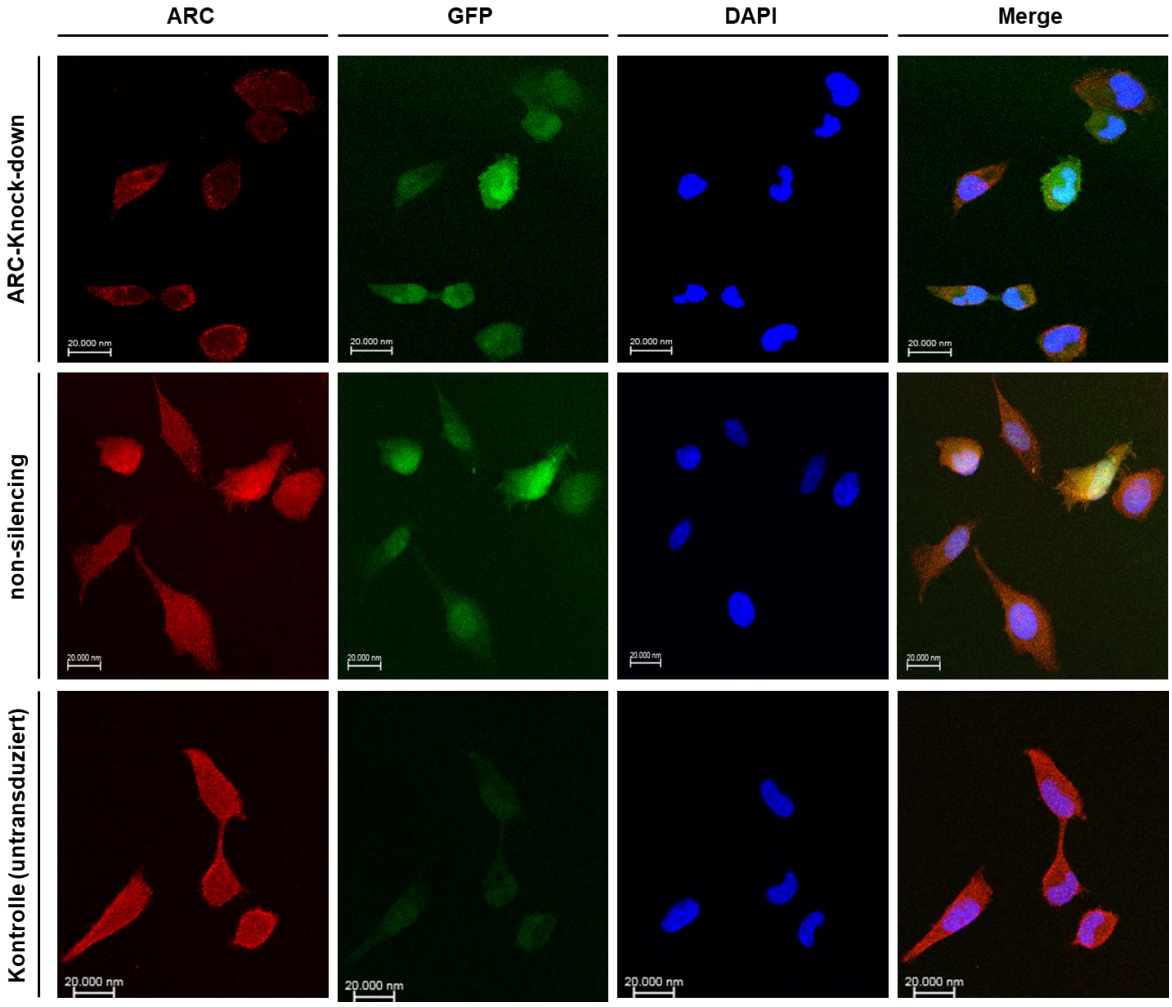


Abb. 7: ARC-Lokalisation in der RMS-Zelllinie TE-671 nach ARC-Knock-down. Die Lokalisation von ARC wurde bei 617 nm (rot) mittels Lasermikroskopie detektiert (linke Spalte). Die Zellkerne wurden bei 450 nm mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt (blau). Das GFP-Signal sowie die Eigenfluoreszenz der Zellen wurden bei 502 nm aufgenommen (grün). Ein überlappendes Abbild aller drei Kanäle ist für jede Zellpopulation in der rechten Spalte aufgeführt (*merge*). Exemplarische Darstellung repräsentativer Zellgruppen. Vergrößerung: 40x.

In den untransduzierten und in den mit *non-silencing*-shRNA transduzierten Zellen befand sich ARC sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Für die untransduzierte Zellpopulation ließ sich die ARC-Verteilung in beiden Zellkompartimenten als homogen beschreiben. Dies traf ebenfalls auf den überwiegenden Teil der mit *non-silencing*-shRNA transduzierten Zellen zu. Eine abschnittsweise scheinbar nukleär betonte ARC-Expression in einigen wenigen *non-silencing*-Zellen wurde als Lageartefakt gewertet.

3.1.3 Abhängigkeit der Proliferation der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 von ARC

Zur Charakterisierung der antiapoptotischen Funktion von ARC im RMS wurde zunächst dessen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen unter Normalbedingungen untersucht. Dazu wurden die TE-671-Zellen in einer Dichte von 3000 Zellen pro *Well* auf einer 96-*Well*-Platte ausgesät. Die Lebendzellzahl der Zellen, welche mit den ARC-shRNA-Plasmiden transduziert wurden, wurde im Zeitraum von 7 Tagen täglich mittels MTT-*Assay* bestimmt. Mithilfe einer Kalibrierungskurve erfolgte anschließend die Umrechnung in die Lebendzellzahl pro cm^2. Zur Kontrolle wurden die mit dem *non-silencing*-Vektor transduzierten Zellen herangezogen (Abb. 8).

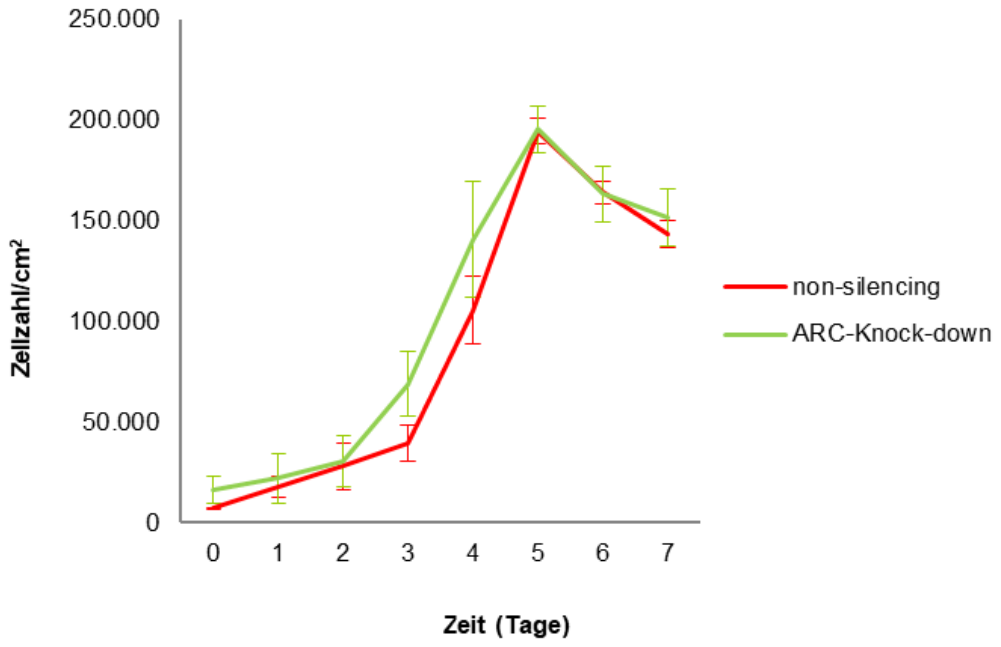


Abb. 8: Wachstumskurven der transduzierten RMS-Zelllinien TE-671. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen wurde die optische Dichte täglich mittels MTT-*Assay* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Messungen.

Durch Auftragen der gemessenen Lebendzellzahlen pro cm^2 gegen die Zeit ergaben sich die in Abb. 8 dargestellten Wachstumskurven. Diesen ist zu entnehmen, dass die ARC-*Knock-down*-Zellen sich bereits an Tag 3 in der Phase des exponentiellen Wachstums befanden. Hier wiesen sie eine Verdopplungszeit von 21 Stunden auf und erreichten an Tag 5 ihr Wachstumsmaximum. Die mit dem *non-silencing*-Vektor transduzierten Zellen traten etwa um einen Tag verzögert in die exponentielle Wachstumsphase ein. Durch eine kürzere Verdopplungszeit von 16 Stunden erreichten sie ihr Wachstumsmaximum wie die ARC-*Knock-down*-Zellen an Tag 5. Die Verdopplungszeit der mit dem *non-silencing*-Vektor transduzierten Zellen war identisch mit der Verdopplungszeit der untransduzierten Zellpopulation (Anhang, Abb. 20). Während der exponentiellen Wachstumsphase führte die verringerte Expression von ARC in den ACR-*Knock-down*-Zellen somit zu einem um 31% verlangsamten Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrollzellgruppe. Diese exponentielle Phase wurde von den ARC-*Knock-down*-Zellen allerdings einen Tag früher erreicht, welches für ein schnelleres Initialwachstum der ARC-*Knock-down*-Zellen spricht. Im Zeitraum zwischen Tag 3 und 4 glichen sich die Wachstumsgeschwindigkeiten beider Zellgruppen in etwa einander an. Sie erreichten an Tag 5 ihr Wachstumsmaximum mit rund 195 000 Zellen pro cm^2. Nach dem Überschreiten der höchsten tolerierbaren Zellzahl gingen die Zellen aus Substrat- und Platzmangel

zugrunde. Hier hatte eine Expressionsminderung an Protein ARC keinen Effekt auf die Wachstumskinetik der RMS-Zellen.
Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ein *Knock-down* des antiapoptotischen Proteins ARC keinen relevanten Einfluss auf das Wachstum der RMS-Zelllinie TE-671 unter Normalbedingungen hatte. Die Zellen mit einer geringeren Expression an ARC teilten sich zwar um ca. 30% langsamer als die Zellen der Kontrollgruppe, der Zelltod trat jedoch in beiden Zellgruppen bei etwa gleicher Zellzahl zum gleichen Zeitpunkt ein.

3.2 Der Knock-down von ARC nimmt Einfluss auf die Expression eines proapoptotischen Mitglieds der Bcl-2-Familie in der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671

Nachdem in 3.1.3 gezeigt werden konnte, dass ein *Knock-down* des antiapoptotischen Proteins ARC keinen relevanten Einfluss auf die Proliferation der untersuchten RMS-Zellen hatte, wurde nun seine Rolle bei der Apoptose untersucht. Dazu wurde zunächst ein möglicher Effekt von ARC auf die Expression pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder geprüft.

3.2.1 Expression proapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder nach ARC-Knock-down

Im Zuge seiner antiapoptotischen Eigenschaften greift ARC wie in 1.4 beschrieben auf mehreren Ebenen in den intrinsischen Apoptosesignalweg ein. So bindet es zum einen an das proapoptotische Effektorprotein Bax und zum anderen interagiert es direkt mit den ebenfalls proapoptotischen Sensitiviererproteinen PUMA und Bad (**GUSTAFSSON** et al., 2004; **LI** et al., 2008). In 3.1.2 konnte gezeigt werden, dass ARC im Zytosol der untersuchten RMS-Zelllinie deutlich exprimiert wird. Somit besteht potenziell die Voraussetzung für eine Interaktion von ARC mit Mitgliedern der Bcl-2-Familie, da diese ebenfalls im zytosolischen Zellkompartiment entweder frei gelöst oder membrangebunden lokalisiert sind. Um das mögliche Zusammenspiel zwischen ARC und den proapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern in der RMS-Zelllinie TE-671 näher zu untersuchen, wurde die Expression der Effektorproteine Bax, Bak und ihres Strukturverwandten Bok, des Sensitivierers PUMA sowie der Aktivatorproteine Bim und Bid nach einem ARC-*Knock-down* mittels Western Blot bestimmt. Außerdem wurde die

Expression einer kurzen proapoptotischen Splicingvariante von Mcl-1, dem Protein Mcl-1 S (34 kDa), im RMS untersucht. Seine funktionelle Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe der proapoptotischen Proteine ist noch unklar.

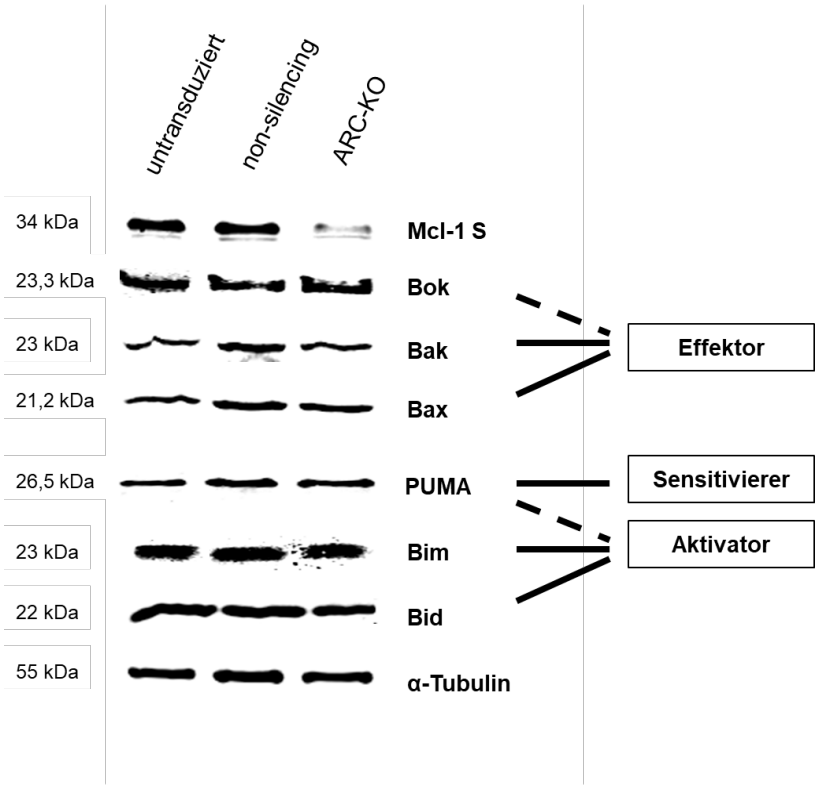


Abb. 9: Auswirkungen des ARC-Knock-downs auf die Expression proapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder in der RMS-Zelllinie TE-671. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Auftragungsmenge diente α-Tubulin und wurde hier exemplarisch für einen Blot dargestellt. Die Einteilung der Proteine in die Gruppen „Effektor", „Sensitivierer" und „Aktivator" erfolgte nach **CERTO** et al., 2006. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; kDa: Kilodalton.

Aus Abb. 9 wird ersichtlich, dass ein *Knock-down* von ARC zu einer Reduktion der Expression von Mcl-1 S (*short*) in der untersuchten RMS-Zelllinie TE-671 führte. Verglichen mit der Kontrollgruppe, welche mit dem *non-silencing*-Vektor transduziert wurde, konnte nach dem ARC-*Knock-down* eine relative Reduktion der Expression von Mcl-1 S nachgewiesen werden. Die zusätzlich zur Kontrolle herangezogene untransduzierte Nierenzellkarzinomzelllinie ClearCa-6 wies eine zur untransduzierten RMS-Zelllinie analoge Expression von Mcl-1 S auf (Anhang, Abb. 21). Somit kann vermutet werden, dass der Effekt der Expressionsreduktion von Mcl-1 S im RMS ARC-abhängig war.

Bei den restlichen sechs untersuchten proapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern führte ein *Knock-down* von ARC zu keinem deutlichen Unterschied im Expressionsmuster. Die Expression der proapoptotischen Proteine Bax, Bak, Bok, PUMA, Bim und Bid zeigte somit allenfalls nur eine geringe ARC-abhängige Regulation.
Es konnte nachgewiesen werden, dass alle drei verwendeten RMS-Zellpopulationen mindestens einen Vertreter der drei funktionellen proapoptotischen Proteingruppen der Effektoren, Aktivatoren und Sensitivierer exprimierten und somit ein potenzielles Angriffsziel für antiapoptotische Proteine wie ARC boten.
Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Expression des proapoptotischen Proteins Mcl-1 S der stärksten ARC-abhängigen Regulation unterliegt. Die Expression anderer proapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder wird dagegen weniger ARC-abhängig reguliert.

3.2.2 Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder nach ARC-Knock-down

ARC hemmt durch seine Bindung an die proapoptotischen Proteine Bax, PUMA und Bad den intrinsischen Apoptosesignalweg (**GUSTAFSSON** et al., 2004). Dabei wirkt es synergistisch mit den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie, die ebenfalls die Eigenschaft besitzen, proapoptotische Proteine zu binden und diese an der Initiierung der Apoptose zu hindern (**TAN** et al., 2006). Nachdem in 3.2.1 gezeigt werden konnte, dass ein *Knock-down* von ARC bei den hier untersuchten proapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern seinen stärksten Einfluss auf die Expression des proapoptotischen Proteins Mcl-1 S nimmt, wurde nun seine Auswirkung auf die Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder im RMS untersucht.

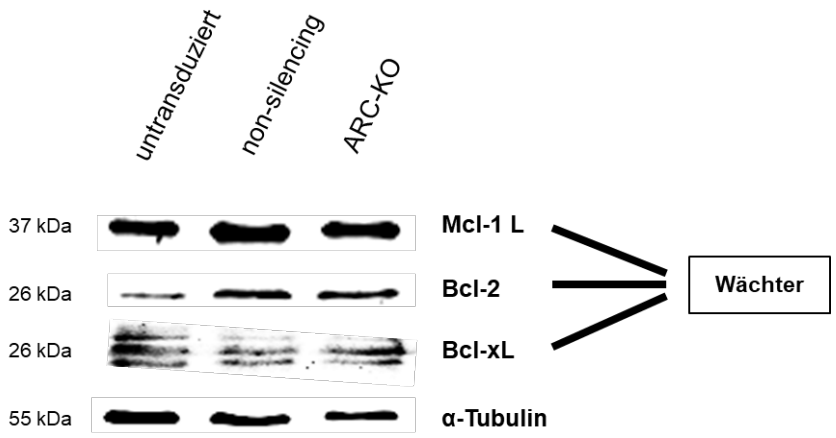


Abb. 10: Auswirkungen des ARC-Knock-downs auf die Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder in der RMS-Zelllinie TE-671. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Auftragungsmenge diente α-Tubulin und wurde hier exemplarisch für einen Blot dargestellt. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; kDa: Kilodalton.

Wie in Abb. 10 zu sehen, konnte für die längere antiapoptotische Splicingvariante von Mcl-1, das Protein Mcl-1 L (37 kDa), keine deutliche Änderung der Expression im Vergleich von ARC-*Knock-down*-Zellen und der transduzierten Kontrollgruppe (*non-silencing*) detektiert werden. Allerdings war die Expression im Vergleich zu den untransduzierten TE-671-Zellen erhöht. Hier kam es im Zuge der Transduktion der Zellen mit lentiviraler shRNA zu einem tendenziellen Anstieg in der Mcl-1-L-Expression.

Des Weiteren zeigte sich nach einem *Knock-down* des antiapoptotischen Proteins ARC keine deutliche Veränderung in der Proteinexpression der ebenfalls antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Im Vergleich zur Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6 konnte für beide Proteine, jedoch besonders für Bcl-xL, eine tendenziell schwache Expression im RMS detektiert werden (Anhang, Abb. 22). Im Gegensatz zu Bcl-2 und Bcl-xL wies die untransduzierte RMS-Zelllinie TE-671 eine sehr starke Expression von Mcl-1 L auf.

Somit zeigte sich für die antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder im RMS eine Verschiebung der Expression hin zum antiapoptotischen Mcl-1 L während die Proteine Bcl-2 und Bcl-xL nur sehr schwach exprimiert wurden. Eine ARC-abhängige Regulation dieser Proteine konnte nicht nachgewiesen werden.

3.3 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die Sensitivität der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 gegenüber dem selektiven Bcl-2-Inhibitor ABT-263

Um die Rolle von ARC bei der Inhibierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs in der RMS-Zelllinie TE-671 zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Bcl-2-Proteinfamilieninhibitor ABT-263 behandelt. ABT-263 induziert intrazelluläre Apoptosevorgänge, indem es die BH3-Bindungstasche von Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w blockiert. Bei der Wahl einer geeigneten Dosierung und Behandlungsdauer mit ABT-263 wurde eine eingehende Literaturrecherche betrieben. Lock und Kollegen haben bisher als einzige Arbeitsgruppe die ABT-263-Sensitivität von RMS-Zellen an den TE-671-verwandten RD-Zellen *in vitro* untersucht und diese für ABT-263-resistent befunden. Zahlreiche phänotypische, zytogenetische, immunhistochemische und DNA-Analysen haben identische Muster in den Zelltypen RD und TE-671 ergeben. Somit wird davon ausgegangen, dass die TE-671-Zellen Subklone der RD-Zellen sind und beide derselben Zelllinie entspringen (**Chen** et al., 1989; **Stratton** et al., 1989). In ihrer Phase-I-Studie inkubierten die Wissenschaftler um Lock insgesamt 23 pädiatrische Krebszelllinien mit ABT-263 in einer Dosierung von 1 nM bis 10 µM für 96 Stunden. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) lag hier bei 1,91 µM. Auch andere Forschungsgruppen definierten 5 µM als diejenige Dosierung, welche auf ABT-263-sensible Zellen tödlich wirkt. Diejenigen Zellen, welche erst bei einer höheren ABT-263-Dosierung (>10 µM) abstarben, wurden als ABT-263-resistent definiert. Die Behandlungsdauer mit ABT-263 variiert in der Literatur stark zwischen 8 und 96 Stunden (**Tse** et al., 2008, **Lock** et al., 2008; **Mérino** et al., 2012; **Renault** et al., 2014; **Leverson** et al., 2015; **Smith** et al., 2017). Eine Induktion apoptotischer Prozesse konnte jedoch bereits nach einer 4- bzw. 6-stündigen Behandlung mit ABT-263 gezeigt werden (**Leverson** et al., 2015; **Tse** et al., 2008). Ferner führte die Vorgängersubstanz von ABT-263, ABT-737, welche den gleichen Wirkmechanismus aufweist, jedoch nicht oral verfügbar ist, nach einer 6-stündigen Behandlungszeit zu einer Caspaseaktivierung in TE-671-Zellen (**Preuss** et al., 2013).

Das in dieser Arbeit verwendete Zytostatikum ABT-263 liegt in gelöster Form vor, wobei das organische Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel dient. Um einen möglichen zytostatischen Effekt von DMSO auszuschließen, wurden alle drei Zellgruppen mit DMSO in äquivalenter Dosierung (10 µM) als Behandlungskontrolle für 6, 12 und 24 Stunden inkubiert.

3.3.1 ABT-263 führt zur Spaltung von PARP

In 3.2.2 konnte die Expression von Bcl-2 und Bcl-xL, den primären Zielproteinen von ABT-263, in den RMS-Zellen nachgewiesen werden. Nun wurde untersucht, ob eine Behandlung mit ABT-263 die Apoptose in TE-671-Zellen induzieren kann.

Nach einer 6-, 12- und 24-stündigen Behandlungsdauer mit 10 µM ABT-263 wurden die RMS-Zellen einer Untersuchung mittels Western Blot unterzogen. Der Western Blot diente dem Nachweis des DNA-Reparaturenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1, kurz PARP, in den Zellen. Dieses 116 kDa große Protein ist eines der Zielproteine von Effektorcaspase-3 und wird im Zuge der apoptotischen Endstrecke in zwei kleinere Spaltprodukte von 89 und 24 kDa prozessiert (**LAZEBNIK** et al., 1994). Das mittels Western Blot detektierte 89 kDa große PARP-Spaltprodukt bietet einen etablierten Nachweis von stattfindender Apoptose (**KAUFMANN** et al., 1993).

Wie in Abb. 11 zu sehen, konnte nach der Behandlung mit ABT-263, jedoch nicht mit dem Lösungsvermittler DMSO, zu allen Behandlungszeitpunkten eine PARP-Spaltung in der RMS-Zelllinie TE-671 nachgewiesen werden. Auch in den ARC-*Knock-down*-Zellen und der transduzierten Kontrollgruppe *(non-silencing*) führte die Behandlung mit ABT-263 zur Spaltung des Proteins PARP. In allen drei Zellgruppen konnte die PARP-Spaltung durch längere Inkubationsdauer tendenziell verstärkt werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass das BH3-Mimetikum ABT-263 zur Apoptoseinduktion in der RMS-Zelllinie TE-671 geeignet ist.

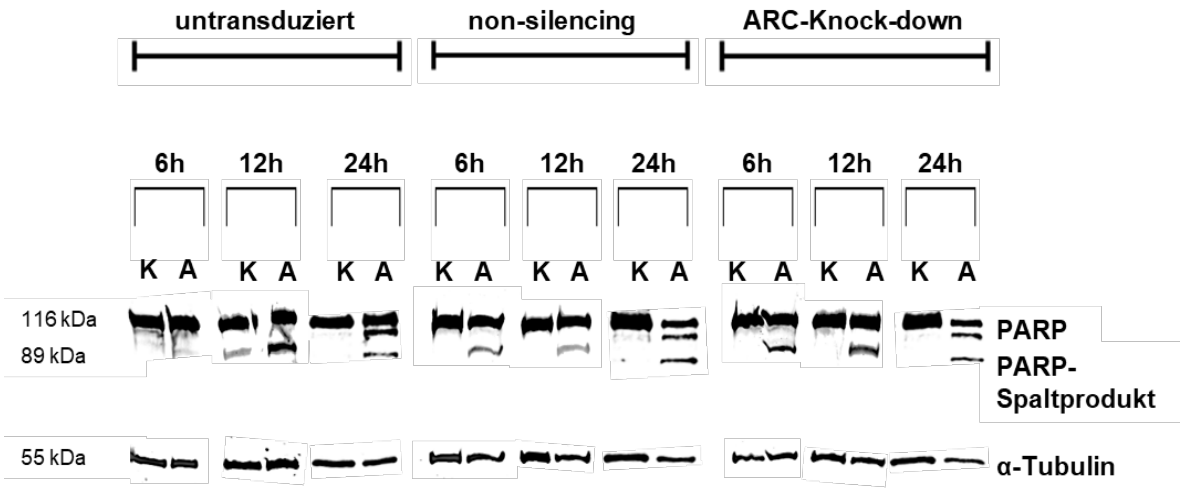


Abb. 11: Effekt des ARC-Knock-downs auf die Spaltung von PARP nach ABT-263-Induktion im RMS. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Auftragungsmenge diente α-Tubulin. Die Zellen wurden für 6, 12 und 24 Stunden mit 10 µM ABT-263 behandelt. Exemplarische Darstellung für zwei unabhängig durchgeführte Versuche. K: DMSO-Kontrolle; A: ABT-263; kDa: Kilodalton.

3.3.2 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die ABT-263-induzierte Aktivierung der Caspasen-9, -8 und -3

Nachdem in 3.3.1 der Nachweis einer ABT-263-induzierten Apoptose in TE-671-Zellen erbracht werden konnte, wurde nun die Aktivierung der Schlüsselenzyme der Apoptose, der Caspasen-9, -8 und -3 untersucht. Die Betrachtung der Aktivitätsmuster von Caspase-9 und -8 erlaubt neben dem Nachweis stattfindender Apoptose vor allem die Differenzierung zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptosesignalweg.
Die Zellen wurden analog zu den oben beschriebenen Versuchen für einen Zeitraum von 6, 12 und 24 Stunden mit 10 µM ABT-263 behandelt. Anschließend erfolgte eine Aktivitätsmessung der Caspasen-9, -8 und -3 mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurden die Zellen nach der entsprechenden Inkubationszeit mit ABT-263 für ca. 45 Minuten mit dem fluoreszenzgekoppelten Substrat der zu untersuchenden Caspase versetzt. Im Falle einer Aktivierung der entsprechenden Caspase wird das Substrat durch das aktivierte Enzym gebunden und die daraus resultierende Fluoreszenzzunahme im Durchflusszytometer detektiert. Da sowohl die *non-silencing-* als auch die ARC-*Knock-down*-Zellen den grünen Fluoreszenzfarbstoff turboGFP exprimieren, wurde für das Caspase-Assay ein rotes Sulforhodamin-gekoppeltes Substrat gewählt. Dieses konnte im FL2-Kanal bei einer Wellenlänge von 575 nm detektiert werden. Die grüne Eigenfluoreszenz (turboGFP) der transduzierten Zellen konnte bei einer Wellenlänge von 525 nm im FL1-Kanal dargestellt werden (Anhang, Abb. 23). Um diejenigen Zellen von der Untersuchung auszuschließen, welche den Transduktionsvektor nicht erfolgreich in sich aufgenommen haben, wurden nur diejenigen unter den transduzierten Zellen selektiert, die den grünen Fluoreszenzfarbstoff exprimiert haben. Die Expression des grünen turboGFP diente somit als Zeichen der lentiviralen Transduktion. Die so erhobenen Ergebnisse waren unabhängig von der Transduktionseffizienz, da nur die Signale der erfolgreich transduzierten Zellen berücksichtigt wurden. Da die nativen Rhabdomyosarkomzellen auch ohne eine Transduktion in einem geringen Maße eine Eigenfluoreszenz sowohl im grünen als auch im roten Kanal aufwiesen, wurde diese Eigenfluoreszenz der Zellen nach einer Behandlung mit ABT-263 von den Messergebnissen subtrahiert. Somit konnte eine hohe Qualität bei der Analyse der erhobenen Fluoreszenzsignale gewährleistet werden.

Caspase-9

Durch seine inhibierende Wirkung auf die antiapoptotischen Bcl-2-Famlienmitglieder Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w nimmt ABT-263 (Navitoclax) überwiegend Einfluss auf den intrinsischen Apoptosesignalweg. Caspase-9 ist maßgeblich an der Bildung des Apoptosoms nach mitochondrialer Freisetzung von Cytochrom c beteiligt (**Li** et al., 1997). Deshalb war es von besonderem Interesse, zunächst die Aktivierung von Initiatorcaspase-9 nach ABT-263-Behandlung in Rhabdomyosarkomzellen zu untersuchen.

Der Anteil der Zellpopulation mit aktivierter Caspase-9 an der Gesamtzellpopulation wurde in den drei Zellgruppen der RMS-Zelllinie TE-671 (untransduzierte, *non-silencing*- und ARC-*Knock-down*-Zellen) nach 6-, 12- und 24-stündiger Behandlung mit 10 µM ABT-263 durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurde das Ergebnis ins Verhältnis zur jeweiligen Kontrollbehandlung mit 10 µM DMSO gesetzt. Für jeden Behandlungszeitpunkt und jede Zellgruppe wurde eine separate DMSO-Kontrolle durchgeführt.

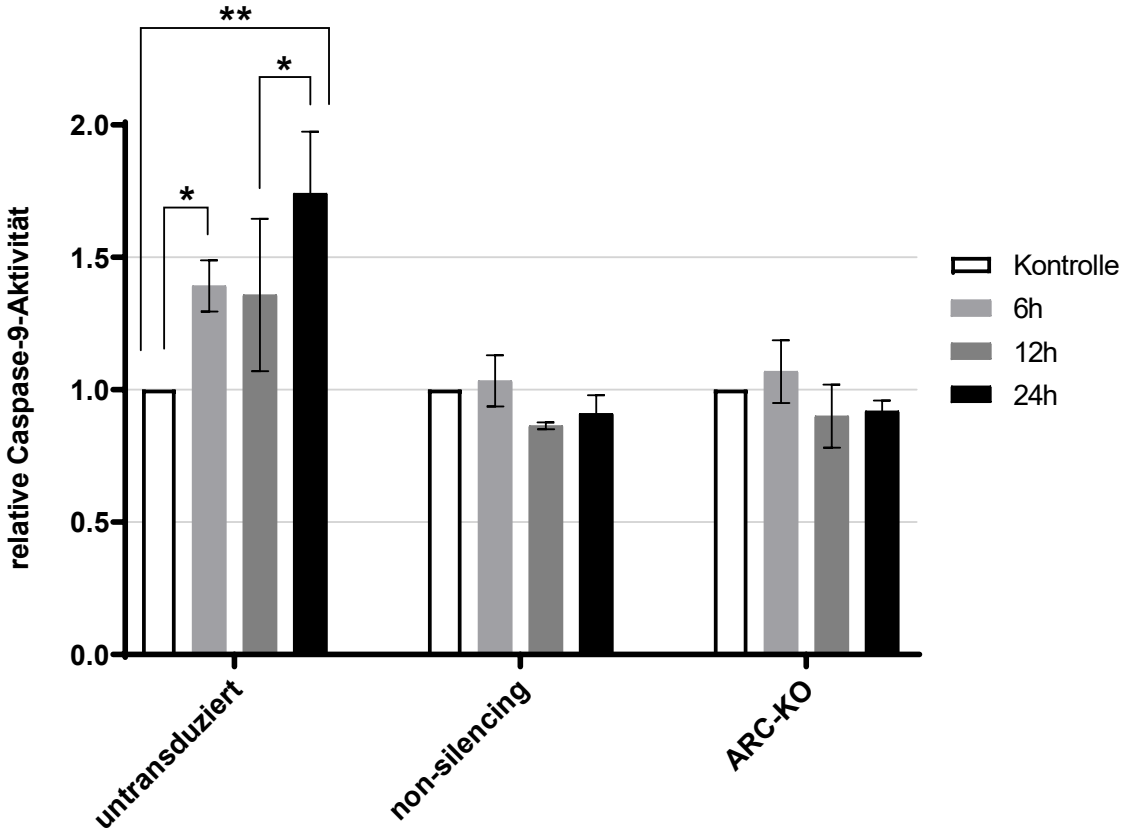


Abb. 12: Effekt des ARC-Knock-downs auf die ABT-263-induzierte Aktivierung von Caspase-9 im RMS. Dargestellt ist der Anteil der Zellpopulation mit aktivierter Caspase-9 an der jeweiligen

Gesamtzellpopulation im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (= 1 gesetzt). Die Ergebnisse bestehen aus Mittelwerten von 3 durchgeführten Versuchsreihen. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. $p < 0,05$: statistisch signifikant (*); $p < 0,01$: sehr signifikant (**). ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Für die untransduzierte Kontrollzellgruppe konnte im Zuge der durchgeführten Versuche eine deutliche zeitabhängige Zunahme der Caspase-9-Aktivität gezeigt werden (Abb. 12). Hier kam es bereits nach 6-stündiger Behandlung mit ABT-263 zu einer signifikanten Zunahme der relativen Caspase-9-Aktivität um 39% ± 10% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (p_{DMSO}= 0,014). Der Effekt von ABT-263 verstärkte sich nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden. Die Größe der relativen Zellpopulation mit aktiver Caspase-9 stieg nach 24 Stunden um 74% ± 23% an und war signifikant gesteigert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (p_{DMSO}= 0,007). Verglichen mit der 12-stündigen Behandlung stieg die relative Caspase-9-Aktivität nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 um 38,3% ± 23% signifikant an (p_{12h}= 0,013). Somit konnte gezeigt werden, dass ABT-263 zu einer Apoptoseinduktion in den RMS-Zellen TE-671 führen kann.
Um nun einen Effekt des ARC-*Knock-downs* auf die ABT-263-induzierte Aktivierung der Caspase-9 zu untersuchen, wurden die ARC-*Knock-down*-Zellen mit der *non-silencing*-Kontrollgruppe nach einer Behandlung mit ABT-263 miteinander verglichen. Der Versuch wurde analog zu den untransduzierten TE-671-Zellen durchgeführt. Es konnte zu keinem Zeitpunkt der Behandlung eine signifikante ARC-abhängige Änderung der Caspase-9-Aktivität durch ABT-263 in der ARC-*Knock-down*-Zellgruppe im Vergleich zur *non-silencing*-Zellgruppe nachgewiesen werden (Tabelle 7).
Eine Induktion des intrinsischen Apoptosesignalwegs durch den Bcl-2-Antagonisten ABT-263 konnte somit für die untransduzierte, jedoch für keine der beiden transduzierten Varianten der RMS-Zelllinie TE-671 gezeigt werden. Ein ARC-abhängiger Effekt von ABT-263 konnte demnach nicht beobachtet werden. Offensichtlich wurde allein durch die Transduktion der Zellen ihre Caspase-9-Aktivität und somit die Induktion des intrinsischen Apoptosesignalwegs entweder gehemmt oder die Detektion der Caspase-9-Aktivität erschwert. In 3.3.1 konnte eine ABT-263-induzierte PARP-Spaltung und somit eine stattfindende Apoptose in allen verwendeten Zellgruppen, inklusive der transduzierten Zellen, nachgewiesen werden. Außerdem ist ABT-263 ein Induktor des intrinsischen Apoptosesignalwegs, dessen Schlüsselenzym Caspase-9 darstellt. Eine Aktivierung der Caspase-9 muss folgerichtig stattgefunden haben. Somit kann darauf geschlossen werden, dass der Transduktionsvorgang per se zu einer erschwerten Caspase-9-Detektion mittels Durchflusszytometrie in den RMS-Zellen geführt hat. Eine valide Aussage bezüglich der Caspase-9-Aktivität in den transduzierten Zellen ließ sich nicht treffen.

Zellgruppen	Behandlungsdauer	ermittelter p-Wert
ARC-KO vs. non-silencing	6h	0,529
	12h	0,677
	24h	0,675

Tabelle 7: Statistische Auswertung der relativen Caspase-9-Aktivität im RMS nach ARC-Knock-down und Behandlung mit ABT-263. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. $p<0,05$: statistisch signifikant; $p< 0,01$: sehr signifikant. Der ermittelte p-Wert der Caspase-9-Aktivität in den untransduzierten, mit ABT-263 behandelten Kontrollzellen betrug gemessen an der DMSO-Kontrollgruppe nach 6 Stunden 0,014, nach 12 Stunden 0,196 und nach 24 Stunden 0,007. ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Caspase-8

Der intrinsische und extrinsische Apoptosesignalweg sind zwei unabhängig voneinander ablaufende Prozesse. Es existieren zwischen ihnen jedoch zahlreiche Schnittstellen, die beispielsweise zu einer Mitaktivierung des intrinsischen Signalwegs durch einen Induktor der extrinsischen Apoptose führen können (**LUO** et al., 1998). In Anlehnung an diese Überlegung sollte der Effekt des Bcl-2-Antagonisten ABT-263 auf die sekundäre Aktivierung von Caspase-8 in der RMS-Zelllinie TE-671 in Abhängigkeit von ARC untersucht werden. Als Teil des DISC-Komplexes, dem die Caspase-8 in ihrer inaktiven Form als Procaspase angehört, repräsentiert sie neben Caspase-10 die zentrale Initiatorcaspase des extrinsischen Apoptosesignalwegs (**SALVESEN UND DIXIT**, 1999).

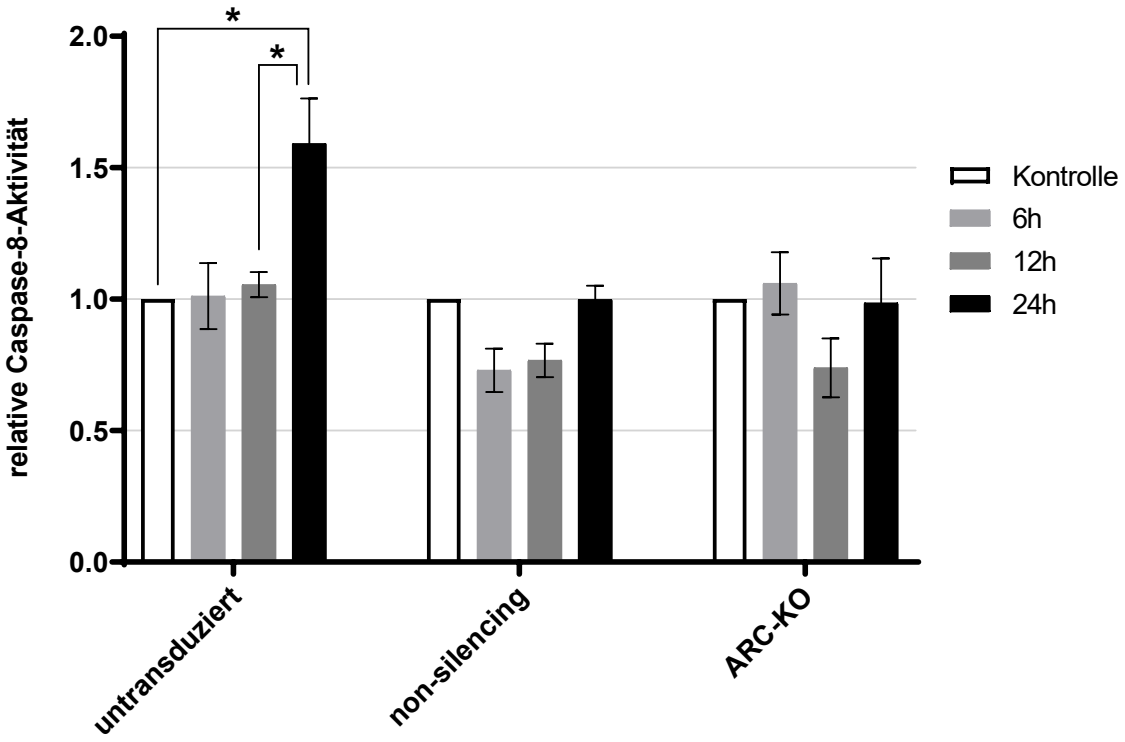


Abb. 13: Effekt des ARC-Knock-downs auf die ABT-263-induzierte Aktivierung von Caspase-8 im RMS. Dargestellt ist der Anteil der Zellpopulation mit aktivierter Caspase-8 an der jeweiligen Gesamtzellpopulation im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (= 1 gesetzt). Die Ergebnisse bestehen aus Mittelwerten von 3 durchgeführten Versuchsreihen. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. $p < 0{,}05$: statistisch signifikant (*). ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Analog zu den Versuchen zur Caspase-9-Aktivität, konnte in den untransduzierten Rhabdomyosarkomzellen ein deutlicher zeitabhängiger Effekt von ABT-263 auf die Caspase-8-Aktivität beobachtet werden (Abb. 13). Dieser fiel erwartungsgemäß schwächer aus und trat verglichen mit der Caspase-9-Aktivität mit einer zeitlichen Verzögerung ein, da ABT-263 primär den intrinsischen Apoptosesignalweg induziert. Gemessen an der DMSO-Kontrolle bewirkte ABT-263 in den untransduzierten Zellen nach 24 Stunden eine signifikante Zunahme der Caspase-8-Aktivität um 59% ± 17% (p_{DMSO}= 0,027). Verglichen mit der 12-stündigen Behandlung stieg die relative Caspase-8-Aktivität nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 um 53,6% ± 17% signifikant an (p_{12h}= 0,032). Zu früheren Behandlungszeitpunkten konnte hingegen kein signifikanter Anstieg der Caspase-8-Aktivität in untransduzierten TE-671-Zellen nach ABT-263-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden (Tabelle 8).

Um einen Effekt des ARC-*Knock-downs* auf die ABT-263-induzierte Aktivierung der Caspase-8 zu untersuchen, wurden die ARC-*Knock-down*-Zellen anschließend mit der *non-silencing*-Kontrollgruppe nach einer Behandlung mit ABT-263 verglichen. Analog zu den Ergebnissen der Caspase-9-Aktivität konnte zu keinem Zeitpunkt der Behandlung eine signifikante ARC-abhängige Zunahme der Caspase-8-Aktivität durch ABT-263 in der ARC-*Knock-down*-Zellgruppe im Vergleich zur *non-silencing*-Zellgruppe nachgewiesen werden.
Für die untransduzierten Rhabdomyosarkomzellen konnte ein signifikanter, zeitlich verzögerter, ABT-263-induzierter Anstieg der Caspase-8-Aktivität nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Wildtyp-TE-671-Zellen mit dem Bcl-2-Antagonisten ABT-263 neben der bereits untersuchten Induktion des intrinsischen Apoptosesignalwegs zu einer Mitaktivierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs geführt hat. Der *Crosstalk* zwischen den beiden Apoptosesignalwegen scheint in der Wildtyp-TE-671-Zelllinie intakt zu sein.

Zellgruppen	Behandlungsdauer	ermittelter p-Wert
ARC-KO vs. non-silencing	6h	0,094
	12h	0,765
	24h	0,915

Tabelle 8: Statistische Auswertung der relativen Caspase-8-Aktivität im RMS nach ARC-Knock-down und Behandlung mit ABT-263. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. $p<0,05$: statistisch signifikant. Der ermittelte p-Wert der Caspase-8-Aktivität in den untransduzierten, mit ABT-263 behandelten Kontrollzellen betrug gemessen an der DMSO-Kontrollgruppe nach 6 Stunden 1, nach 12 Stunden 0,186 und nach 24 Stunden 0,027. ARC KO: ARC-*Knock-down*.

Caspase-3

Die Initiierung des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalwegs mündet schließlich in der gemeinsamen Endstrecke der Apoptose, der Aktivierung von Effektorcaspase-3. Hiernach werden die proapoptotischen Mechanismen in Gang gesetzt und die Zelle „begeht" den programmierten Zelltod (**RIEDL und SHI**, 2004). Die Effektorcaspase-3 befindet sich weiter unten im Apoptosesignalweg und wird durch die bereits aktiven Caspasen-9 und -8 durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Abhängigkeit der Caspase-3-Aktivität von der Expression des antiapoptotischen Proteins ARC nach einer

Behandlung mit dem Bcl-2-Inhibitor ABT-263 wurde im Folgenden für die RMS-Zelllinie TE-671 untersucht.

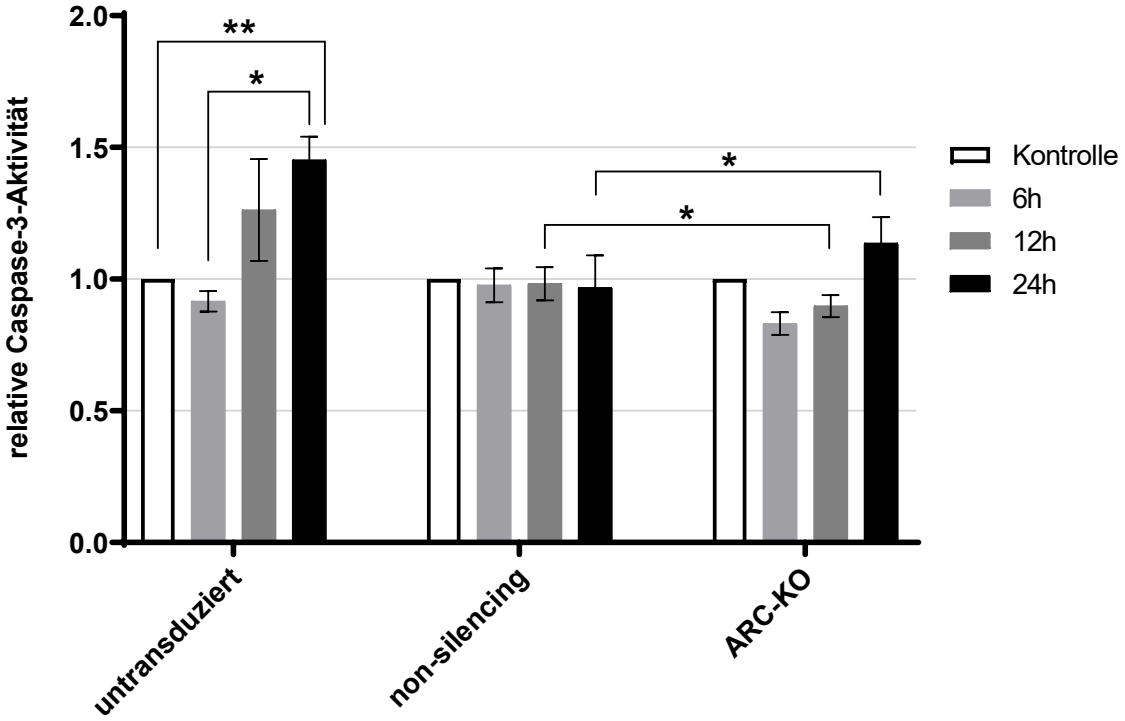


Abb. 14: Effekt des ARC-Knock-downs auf die ABT-263-induzierte Aktivierung von Caspase-3 im RMS. Dargestellt ist der Anteil der Zellpopulation mit aktivierter Caspase-3 an der jeweiligen Gesamtzellpopulation im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (= 1 gesetzt). Die Ergebnisse bestehen aus Mittelwerten von 3 durchgeführten Versuchsreihen. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. $p < 0{,}05$: statistisch signifikant (*); $p < 0{,}01$: sehr signifikant (**). ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Wie bereits für Caspase-9 und -8 gezeigt werden konnte, ließ sich auch für die nachgeschaltete Caspase-3 eine Steigerung der Enzymaktivität in den untransduzierten RMS-Zellen durch ABT-263 induzieren (Abb. 14). Gemessen an der DMSO-Kontrolle bewirkte ABT-263 in den untransduzierten Zellen nach 24 Stunden eine signifikante Zunahme der Caspase-3-Aktivität um 45% ± 9% (p_{DMSO}= 0,003). Verglichen mit der 6-stündigen ABT-263-Behandlung stieg die relative Caspase-3-Aktivität nach 24-stündiger Behandlung der untransduzierten Zellen mit ABT-263 um 54% ± 9% signifikant an (p_{6h}= 0,010). Zu früheren Behandlungszeitpunkten konnte kein signifikanter Anstieg der Caspase-3-Aktivität in untransduzierten TE-671-Zellen nach ABT-263-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden (Tabelle 9). Die Effektorcaspase-3

wird erst beim Durchlaufen der apoptotischen Endstrecke in den Zellen aktiviert. Ihr später Aktivitätsnachweis erscheint daher logisch.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der ABT-263-induzierten Caspase-3-Aktivität in den RMS-Zellen in Abhängigkeit von ihrer ARC-Expression. Die 12-stündige Behandlung der ARC-*Knock-down*-Zellen mit ABT-263 führte zunächst zu einem signifikanten Abfall der relativen Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur *non-silencing*-Kontrolle ($p_{non\text{-}silencing}$= 0,031). Nach einer 24-stündigen Behandlung mit dem Bcl-2-Antagonisten ABT-263 konnte jedoch ein signifikanter ARC-abhängiger Anstieg der relativen Caspase-3-Aktivität gemessen werden. In den ARC-*Knock-down*-Zellen kam es zu einem geringen, jedoch signifikanten Anstieg der relativen Caspase-3-Aktivität um 17% ± 10% verglichen mit der *non-silencing*-Kontrolle ($p_{non\text{-}silencing}$= 0,012). Der ABT-263-induzierte Effekt fiel in den ARC-*Knock-down*-Zellen jedoch um 32% ± 10% geringer aus als in den untransduzierten RMS-Zellen.

Eine deutliche Aktivierung der Effektorcaspase-3 durch den Bcl-2-Antagonisten ABT-263 konnte somit analog zu den Caspasen-9 und -8 für die untransduzierte RMS-Zelllinie TE-671 gezeigt werden. ABT-263 war nachweislich in der Lage, sowohl den intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweg als auch die apoptotische Endstrecke in den RMS-Zellen zu aktivieren. Ein schwacher ARC-abhängiger Anstieg der relativen Caspase-3-Aktivität konnte nach 24 Stunden beobachtet werden. Dieser Anstieg fiel jedoch in den ARC-*Knock-down*-Zellen deutlich geringer aus verglichen mit der untransduzierten Zellgruppe. Ein Synergismus des ARC-*Knock-downs* mit der ABT-263-Behandlung konnte im Hinblick auf die Caspase-3-Aktivität somit nicht beobachtet werden.

Zellgruppen	Behandlungsdauer	ermittelter p-Wert
ARC-KO vs. non-silencing	6h	0,142
	12h	**0,031**
	24h	**0,012**

Tabelle 9: Statistische Auswertung der relativen Caspase-3-Aktivität im RMS nach ARC-Knock-down und Behandlung mit ABT-263. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. p<0,05: statistisch signifikant; p< 0,01: sehr signifikant. Der ermittelte p-Wert der Caspase-3-Aktivität in den untransduzierten mit ABT-263 behandelten Kontrollzellen betrug gemessen an der DMSO-Kontrollgruppe nach 6 Stunden 0,06, nach 12 Stunden 0,091 und nach 24 Stunden 0,003. ARC KO: ARC-*Knock-down*.

3.3.3 Der Knock-down von ARC hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität nach ABT-263-Exposition

In 3.3.1 und 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der TE-671-Zellen mit dem Bcl-2-Antagonisten ABT-263 zur Apoptoseinduktion in den Wildtyp-RMS-Zellen führt. Nun sollte untersucht werden, ob ABT-263 einen Effekt auf das Überleben der RMS-Zellen ausübt und ob dieser ARC-abhängig ist.

Dazu wurden die mit dem ARC-*Knock-down*-Vektor transduzierten Zellen wie bei den vorherigen Experimenten mit dem Bcl-2-Antagonisten ABT-263 in einer Dosis von 10 µM für 6, 12 und 24 Stunden inkubiert. Hiernach wurde die Lebendzellzahl mittels Zellzählung bestimmt. Als Kontrolle eines möglichen Einflusses der lentiviralen Transduktion auf die Vitalität der Zellen nach einer Behandlung mit ABT-263 diente die untransduzierte RMS-Zelllinie TE-671. Das in dieser Arbeit verwendete Zytostatikum ABT-263 liegt in gelöster Form vor, wobei das organische Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel dient. Um einen möglichen zytostatischen Effekt von DMSO auszuschließen, wurden alle drei Zellgruppen mit DMSO in äquivalenter Dosierung (10 µM) als Behandlungskontrolle inkubiert. Die Lebendzellzahl nach 6-, 12- und 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 wurde für alle drei Zellgruppen ins Verhältnis zur Lebendzellzahl der jeweiligen DMSO-Behandlungskontrolle gesetzt und die so gebildete relative Lebendzellzahl graphisch dargestellt (Abb. 15). Anschließend wurde die relative Lebendzellzahl der ARC-Knock-down-Zellen nach einer Behandlung mit ABT-263 mit der relativen Lebendzellzahl der mit *non-silencing*-shRNA transduzierten Zellpopulation verglichen.

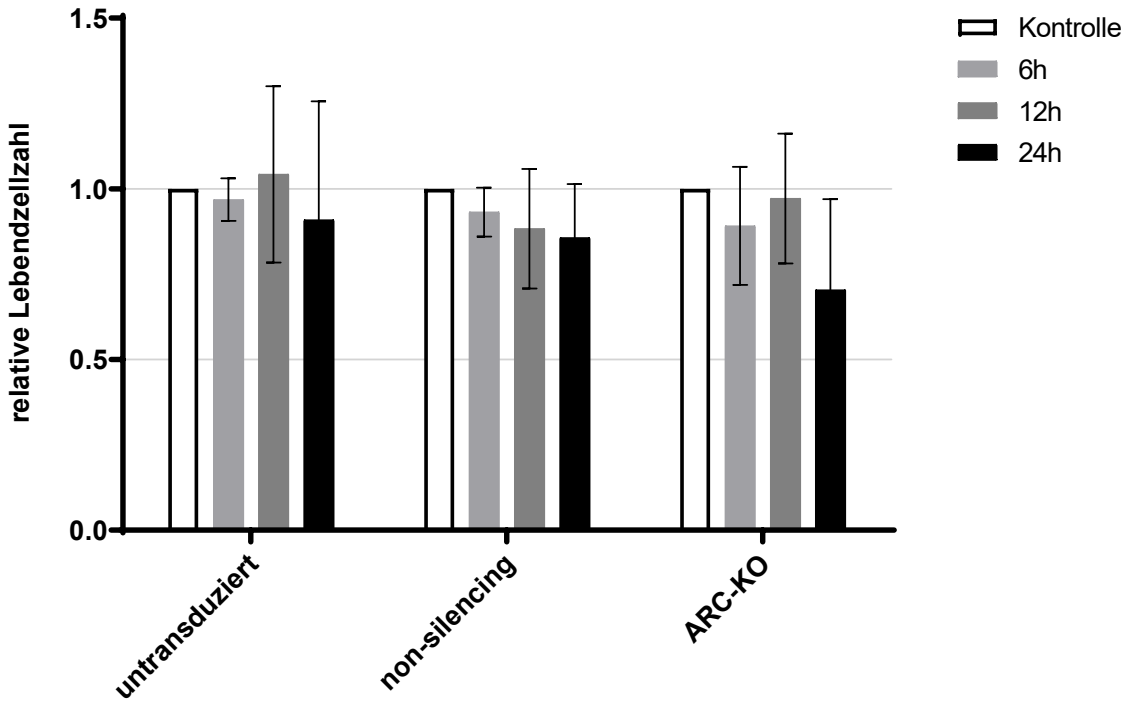


Abb. 15: Effekt des ARC-Knock-downs auf die Zellvitalität der RMS-Zellen nach ABT-263-Exposition. Darstellung der relativen Lebendzellzahlen der RMS-Zellgruppen nach jeweiliger Behandlung mit 10 µM ABT-263 im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (= 1 gesetzt). Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde Student'sche t-Test durchgeführt. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen. ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Für die untransduzierten RMS-Zellen ließ sich verglichen mit der DMSO-Kontrolle zu keinem Behandlungszeitpunkt ein signifikanter Einfluss von ABT-263 auf die relative Lebendzellzahl beobachten (Abb. 15). Die untransduzierte Zellgruppe wies allenfalls nur eine geringe Tendenz zur Reduktion der relativen Lebendzellzahl um 9,2% (± 34,8%) nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf.

Für die ARC-*Knock-down*-Zellgruppe konnte im Zuge der 24-stündigen Behandlung mit ABT-263 ein Trend zur Reduktion der relativen Lebendzellzahl um 29,6% (± 26,6%) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten ARC-*Knock-down*-Zellen nachgewiesen werden (p= 0,09). Verglichen mit den ARC-*Knock-down*-Zellen, welche einer 12-stündigen Behandlung mit ABT-263 unterzogen wurden, kam es nach doppelter Inkubationsdauer von 24 Stunden zu einem Abfall der relativen Lebendzellzahl der ARC-*Knock-down*-Zellen um 26,7% (± 26,6%). Ein signifikanter Unterschied zwischen den ARC-*Knock-down*-Zellen und der *non-silencing*-Kontrolle nach einer 24-stündigen Behandlung mit ABT-263 konnte offenbar aufgrund der hohen Standardabweichung nicht gesichert werden (p= 0,864) (Tabelle 10). Nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 zeigte sich eine um

15,2% (± 26,6%) kleinere relative Lebendzellzahl der ARC-*Knock-down*-Zellen verglichen mit den *non-silencing*-Zellen. Die relative Lebendzellzahl der ARC-*Knock-down*-Zellen war nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 um 20,4% (± 26,6%) kleiner als die relative Lebendzellzahl der mit ABT-263 behandelten untransduzierten RMS-Zellen.
Mit dieser Untersuchung konnte kein signifikanter ARC-abhängiger Effekt von ABT-263 auf die Vitalität von RMS-Zellen gezeigt werden. Eine zuvor gezeigte Induktion von Caspase-3 durch ABT-263 hat nach 24 Stunden zu keinem signifikanten Zelltod bei den untersuchten RMS-Zellen geführt. Nach einem *Knock-down* von ARC zeichnete sich bei hoher Inkubationsdauer von 24 Stunden allenfalls ein Trend hin zur erhöhten Sensitivität von RMS-Zellen gegenüber ABT-263 ab. Der Rückgang vitaler Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war in der ARC-*Knock-down*-Gruppe am stärksten ausgeprägt. Der Effekt von ABT-263 schien nach 24 Stunden schwach einzusetzen. Weitere Untersuchungen nach 48- und 96-stündiger Behandlung mit ABT-263 müssten in Zukunft durchgeführt werden, um eine definitive Aussage über einen ARC-abhängigen Zelltod zu treffen.

Zellgruppen	Behandlungsdauer	ermittelter p-Wert
ARC-KO vs. non-silencing	6h	0,322
	12h	0,082
	24h	0,864

Tabelle 10: Statistische Auswertung der relativen Lebendzellzahl im RMS nach ARC-Knock-down und Behandlung mit ABT-263. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. Der ermittelte p-Wert der relativen Lebendzellzahl in den untransduzierten, mit ABT-263 behandelten Kontrollzellen betrug gemessen an der DMSO-Kontrollgruppe nach 6 Stunden 0,29, nach 12 Stunden 0,892 und nach 24 Stunden 0,528. ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

3.4 Der Knock-down von ARC erhöht die Sensitivität der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671 gegenüber dem Todesliganden TRAIL

Nachdem unter 3.3 der Einfluss von ARC auf den intrinsischen Apoptosesignalweg eingehend analysiert wurde, untersuchten wir nun die Rolle von ARC beim extrinsischen Weg der Apoptose in der RMS-Zelllinie TE-671. Hierzu wurde das Zytokin

Super*Killer*TRAIL (skTRAIL) verwendet. Es stellt ein Derivat des natürlich vorkommenden *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) dar, welches ein potenter Induktor des extrinsischen Apoptosesignalwegs ist (**WILEY** et al., 1995, **PITTI** et al., 1996).

3.4.1 Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5

Im Zuge seiner proapoptotischen Funktion setzt der mit dem TNF-Faktor verwandte Todesligand TRAIL den extrinsischen Signalweg der Apoptose durch Bindung an die zellmembranständigen Rezeptoren DR4 oder DR5 in Gang (**SCHNEIDER** et al., 1997). Um die potenzielle Möglichkeit einer TRAIL-Wirkung auf die RMS-Zellen nachzuweisen, wurde die Expression von DR4 und DR5 für die RMS-Zelllinie TE-671 mittels Western Blot untersucht und mit der Expression in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6 verglichen. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, exprimierten alle drei RMS-Zellgruppen sowohl die Vorläufer-(DR5-p) als auch die aktive Form (DR5-m) des DR5-Rezeptors. Es fiel jedoch auf, dass die Expression beider DR5-Formen im RMS deutlich höher war als in der Vergleichszelllinie ClearCa-6. Eine ARC-abhängige Veränderung der DR5-Expression ließ sich nicht beobachten. Die Expression des TRAIL-Rezeptors DR4 konnte sowohl in der RMS- als auch in der Nierenkarzinomzelllinie allenfalls sehr schwach detektiert werden (siehe Anhang, Abb. 24).

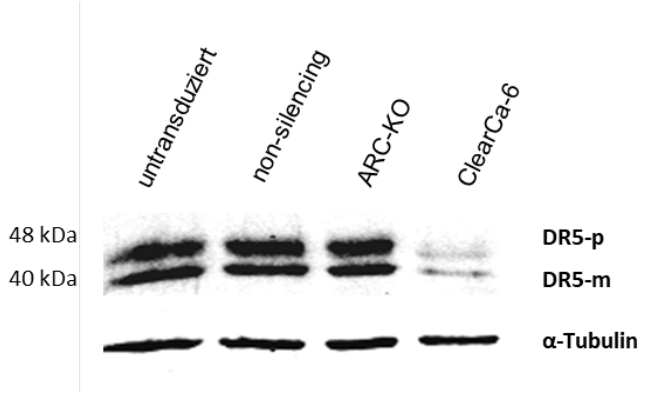


Abb. 16: Expression des DR5-Rezeptors im RMS und in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6. Zur Bestätigung der gleichmäßigen Auftragungsmenge diente α-Tubulin. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; DR5-p: DR5-*precursor*; DR5-m: DR5-*mature*; kDa: Kilodalton.

Somit war die potenzielle Möglichkeit einer TRAIL-Wirkung in den TE-671-Zellen gegeben. Mithilfe von TRAIL sollte eine Induktion extrinsischer Apoptosesignalwege im Folgenden untersucht werden.

3.4.2 TRAIL führt zur Spaltung von PARP

Nachdem unter 3.4.1 eine starke Expression des DR5-TRAIL-Rezeptors im RMS nachgewiesen werden konnte, sollte nun der extrinsische Signalweg der Apoptose mithilfe des Todesliganden skTRAIL induziert werden. Bei der Wahl einer geeigneten Dosierung und Behandlungsdauer mit skTRAIL wurde eine eingehende Literaturrecherche betrieben. Laut Angaben des Herstellers Enzo Scientific findet eine Apoptoseinduktion bei skTRAIL-Konzentrationen von >5 ng/ml und einer Behandlungszeit von 18 Stunden statt. Ein ausgeprägter Effekt auf die Zellvitalität von humanen T-Lymphozyten Jurkat und humanen Burkittlymphomzellen BJAB wurde nach 18-stündiger Behandlung mit skTRAIL demonstriert. Als zu verwendende Arbeitsverdünnung wurden 2-100 ng/ml skTRAIL empfohlen (**ENZO SCIENTIFIC**, Stand 18.02.2023).
Bis dato wurden keine Veröffentlichungen zur Verwendung von skTRAIL in TE-671-Zellen gefunden (Stand 18.02.2023). Die Arbeitsgruppe um Plourde konnte nach einer 16-stündigen Behandlung von TE-671-Zellen mit rekombinantem TRAIL in einer Dosierung von 200 ng/ml eine Apoptoseinduktion nachweisen (**PLOURDE** et al., 2013). Petak und Kollegen konnten für die TE-671-verwandte Zelllinie RD eine signifikante Apoptose- und Zelltodinduktion mit TRAIL-Konzentrationen von 10 bis 100 ng/ml nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden zeigen (**PETAK** et al., 2000). Für die embryonale RMS-Zelllinie Rh1 konnten die Wissenschaftler eine Apoptoseinduktion nach einer bereits 4-stündigen Behandlung mit 25 ng/ml TRAIL detektieren. Diese Arbeitsgruppen verwendeten jedoch nicht das skTRAIL, sondern das herkömmliche TRAIL, welches der Zugabe eines *Enhancers* bedurfte. Dieser stabilisiert und unterstützt das TRAIL bei der Quervernetzung der Rezeptoruntereinheiten. Eine Vergleichbarkeit älterer Arbeiten mit einer Behandlung mit skTRAIL, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, war somit nicht uneingeschränkt gegeben.
In vorangegangenen Dosisfindungsversuchen zu dieser Arbeit wurden untransduzierte TE-671-Zellen für 3, 6, 12 und 24 Stunden mit skTRAIL in einer Dosierung von 1 ng/ml bis 25 ng/ml behandelt (siehe Anhang, Abb. 25 und Abb. 26). Ein Effekt von skTRAIL trat ab einer Konzentration von 15 ng/ml ein.
Für die nachfolgenden Versuche wurden die drei bereits vorgestellten Zellgruppen der TE-671-Zelllinie für 24 Stunden mit dem Todesliganden skTRAIL in einer Konzentration von 10, 50 und 100 ng/ml inkubiert. Als Kontrolle der skTRAIL-Behandlung wurden alle

drei Zellgruppen für 24 Stunden mit dem Medium inkubiert, in dem die Zellen kultiviert wurden.

Um zu klären, ob das skTRAIL in der Lage war, apoptotische Vorgänge in der RMS-Zelllinie TE-671 zu induzieren, wurde analog zu den Versuchen mit ABT-263 (siehe Abschnitt 3.3.1) ein Western Blot zum PARP-Nachweis durchgeführt. Die Spaltung des Caspase-3-Zielproteins PARP wurde nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit skTRAIL in der Dosierung von 10, 50 und 100 ng/ml detektiert. Der Nachweis des 89 kDa großen PARP-Spaltprodukts bietet einen etablierten Beleg für eine stattfindende Apoptose (**KAUFMANN** et al., 1993).

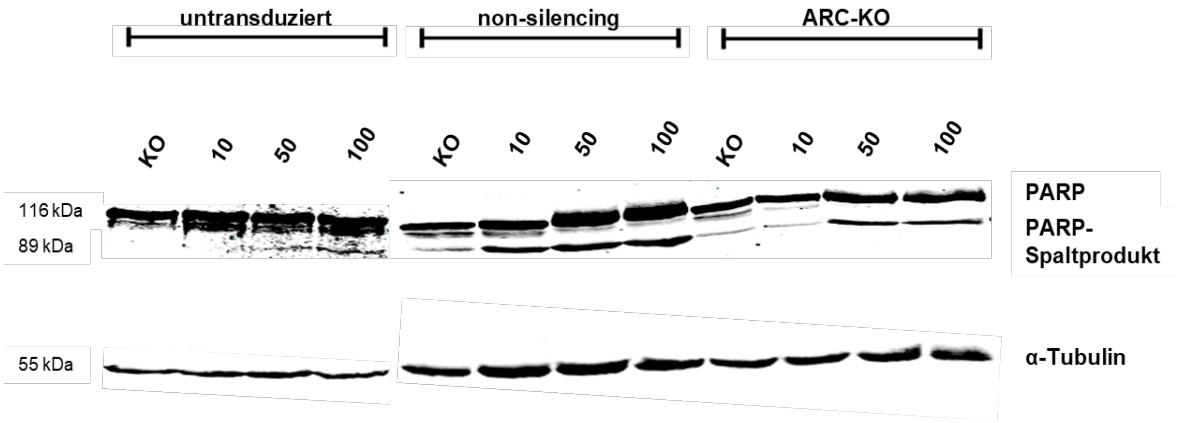


Abb. 17: Spaltung von PARP nach skTRAIL-Behandlung im RMS. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Auftragungsmenge diente das *housekeeping*-Gen α-Tubulin. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 10, 50 und 100 ng/ml skTRAIL oder dem Kontrollmedium behandelt. Exemplarische Darstellung für zwei unabhängig durchgeführte Versuche. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; KO: unbehandelte Kontrolle; kDa: Kilodalton.

Wie in Abb. 17 zu sehen, konnte nach der Behandlung mit skTRAIL eine PARP-Spaltung in der Wildtyp-RMS-Zelllinie TE-671 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle induziert werden. Auch in den ARC-*Knock-down*-Zellen und der transduzierten *non-silencing*-Kontrollgruppe führte die Behandlung mit skTRAIL zur Spaltung des Proteins PARP verglichen zur unbehandelten Kontrolle. In allen drei Zellgruppen konnte die PARP-Spaltung durch höhere skTRAIL-Konzentrationen tendenziell verstärkt werden. Die unbehandelten Zellen wiesen hierbei allenfalls eine schwache Expression des PARP-Spaltprodukts auf, welche möglicherweise auf basale Apoptose zurückzuführen war.

Somit konnte gezeigt werden, dass skTRAIL zur Apoptoseinduktion in der RMS-Zelllinie TE-671 führt.

3.4.3 Der Knock-down von ARC führt zum Zelltod nach TRAIL-Exposition

In 3.4.2 konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der TE-671-Zellen mit skTRAIL zur Apoptoseinduktion in allen Gruppen der RMS-Zellen führt (untransduziert, *non-silencing*, ARC-*Knock-down*). Nun sollte untersucht werden, ob skTRAIL einen Effekt auf das Überleben der RMS-Zellen ausübt und ob dieser ARC-abhängig ist.

Dazu wurden die mit dem ARC-*Knock-down*-Vektor transduzierten Zellen wie bei den obigen Experimenten mit dem Todesliganden skTRAIL in einer Dosis von 10, 50 und 100 ng/ml für 24 Stunden inkubiert. Hierbei wurde die Lebendzellzahl mittels Zellzählung bestimmt. Als Kontrolle eines möglichen Einflusses der lentiviralen Transduktion auf die Vitalität der Zellen nach einer Behandlung mit skTRAIL diente die untransduzierte RMS-Zelllinie TE-671. Als Kontrolle der Behandlung mit skTRAIL diente wie in 3.4.2 beschrieben das Medium, in welchem die Zellen kultiviert wurden. Dieses wurde für ebenfalls 24 Stunden allen drei Zellgruppen zugesetzt. Die Lebendzellzahl nach 24-stündiger Behandlung mit den drei verwendeten skTRAIL-Konzentrationen wurde für die drei Zellgruppen mittels Zellzählung bestimmt. Anschließend wurde diese ins Verhältnis zur Lebendzellzahl nach einer Behandlung mit Kontrollmedium gesetzt. Die so gebildete relative Lebendzellzahl wurde graphisch aufgetragen (Abb. 18). Die relative Lebendzellzahl der ARC-*Knock-down*-Zellen wurde mit der relativen Lebendzellzahl der mit *non-silencing*-shRNA transduzierten Zellpopulation nach skTRAIL-Behandlung verglichen (Tabelle 11).

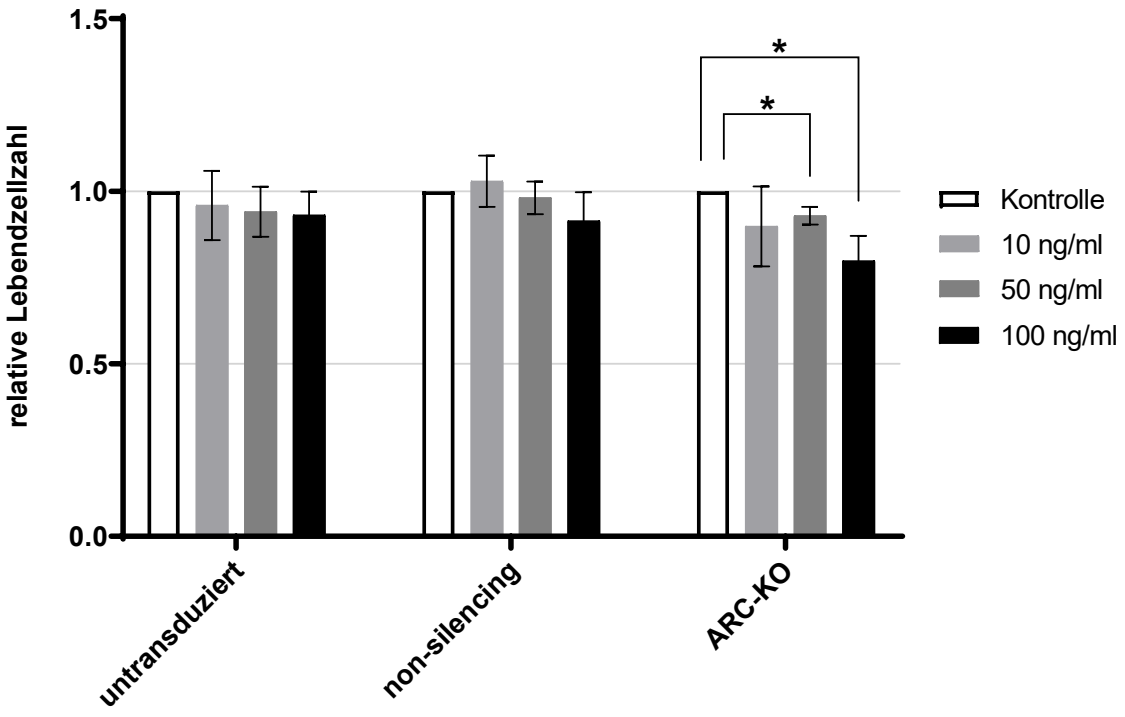


Abb. 18: Effekt des ARC-Knock-downs auf die Zellvitalität der RMS-Zellen nach skTRAIL-Exposition. Darstellung der Lebendzellzahl nach 24-stündiger Behandlung mit skTRAIL (10, 50 und 100 ng/ml) im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (= 1 gesetzt). Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. $p<0,05$: statistisch signifikant (*). Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen mit insgesamt 4 Wiederholungen. ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Für die untransduzierten RMS-Zellen konnte mit keiner der verwendeten skTRAIL-Konzentrationen ein signifikanter Abfall der Lebendzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24 Stunden induziert werden (Abb. 18).

Die bei den untransduzierten RMS-Zellen beobachtete Resistenz gegenüber skTRAIL konnte durch einen *Knock-down* von ARC überwunden werden. Nach einer 24-stündigen Behandlung der ARC-*Knock-down*-Zellen mit 50 ng/ml skTRAIL konnte ein signifikanter Abfall der Lebendzellzahl um 7% ± 3% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden (p= 0,015). Dieser Effekt konnte durch eine höhere skTRAIL-Konzentration verstärkt werden. Die 24-stündige Behandlung der ARC-*Knock-down*-Zellen mit 100 ng/ml skTRAIL führte zu einem signifikanten Abfall der Lebendzellzahl um 20% ± 7% verglichen zur unbehandelten Kontrolle (p= 0,011). In der *non-silencing*-Zellgruppe konnte kein signifikanter Abfall der Lebendzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch skTRAIL beobachtet werden. Der signifikante Rückgang vitaler Zellen nach einer skTRAIL-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

war somit ausschließlich in der ARC-*Knock-down*-Zellgruppe, jedoch nicht in den *non-silencing*- oder den untransduzierten RMS-Zellen nachweisbar. Für keine der verwendeten skTRAIL-Konzentrationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den ARC-*Knock-down* und den *non-silencing*-Zellen gesichert werden (Tabelle 11). Nach einer Behandlung mit 100 ng/ml skTRAIL konnte jedoch ein Trend hin zu einer um 11% ± 7% geringeren Lebendzellzahl in den ARC-*Knock-down*-Zellen verglichen mit *non-silencing*-Zellen beobachtet werden (p= 0,079).

Zellgruppen	skTRAIL-Konzentration	ermittelter p-Wert
ARC-KO vs. non-silencing	10 ng/ml	0,106
	50 ng/ml	0,104
	100 ng/ml	0,079
ARC-KO: skTRAIL vs. unbehandelte Kontrolle	10 ng/ml	0,171
	50 ng/ml	**0,015**
	100 ng/ml	**0,011**

Tabelle 11: Statistische Auswertung der relativen Lebendzellzahl im RMS nach ARC-Knock-down und Behandlung mit skTRAIL. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes wurde der Student'sche t-Test durchgeführt. p<0,05: statistisch signifikant. Der ermittelte p-Wert der relativen Lebendzellzahl in den untransduzierten, mit skTRAIL behandelten Kontrollzellen betrug gemessen an der unbehandelten Kontrollgruppe nach 10 ng/ml 0,316, nach 50 ng/ml 0,171 und nach 100 ng/ml 0,149. ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

Mit dieser Untersuchung konnte zum ersten Mal der Hinweis auf einen ARC-abhängigen Effekt von skTRAIL auf die RMS-Zelllinie TE-671 geliefert werden. Obwohl es keinen eindeutig signifikanten Unterschied zwischen den ARC-*Knock-down*- und den *non-silencing*-Zellen nach einer Behandlung mit skTRAIL gab, waren die ARC-*Knock-down*-Zellen als einzige unter den drei untersuchten Zellgruppen sensibel auf skTRAIL im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Somit wurde der erste Hinweis dafür geliefert, dass das antiapoptotische Protein ARC eine Rolle beim extrinsischen Apoptosesignalweg in der RMS-Zelllinie TE-671 spielt.

4 Diskussion

Krebszellen exprimieren häufig große Mengen an antiapoptotischen Faktoren der Bcl-2-Proteinfamilie. Dies führt zu einem Schutz vor dem natürlichen oder therapieinduzierten Zelltod.
In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Abnahme der Expression des überlebensfördernden Proteins ARC das Ansprechen von Rhabdomyosarkomzellen auf Induktoren intrinsischer und extrinsischer Apoptose verbessern kann. Außerdem wurde analysiert, ob ARC einen Einfluss auf die Expression pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Proteine nimmt, um seine Rolle bei apoptotischen Vorgängen im Rhabdomyosarkom besser verstehen zu können.

4.1 Die Inhibition von Bcl-2 durch ABT-263 induziert Apoptose in Rhabdomyosarkomzellen

Das oral verfügbare Zytostatikum ABT-263 ist ein potenter und selektiver Inhibitor der antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w. Erste Phase-I-Studien sowohl in soliden Tumoren als auch in Neoplasien der hämatologischen Reihe lieferten vielversprechende Ergebnisse (**Gandhi** et al., 2011; **Roberts** et al., 2012). Anschließende Phase-II-Studien schränkten die Wirksamkeit von ABT-263 als Monotherapeutikum jedoch ein und unterstrichen die Notwendigkeit einer Kombinationstherapie (**Rudin** et al., 2012; **Kipps** et al., 2015; **Kivioja** et al., 2019). ABT-263 blockiert die BH3-Bindungstasche von oben genannten antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen und wirkt damit proapoptotisch auf die Zellen (**Oltersdorf** et al., 2005). Die Expression der antiapoptotischen ABT-263-Zielproteine Bcl-2 und Bcl-xL in der RMS-Zelllinie TE-671 konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Um Apoptose zu induzieren, ist ABT-263 außerdem auf das Vorhandensein der proapoptotischen Effektorproteine Bax und Bak angewiesen (**Renault** et al., 2014; **van Delft** et al., 2006). Die Expression von Bax und Bak in TE-671-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden. Somit waren wichtige Voraussetzungen erfüllt, um die Wirkung von ABT-263 im embryonalen RMS zu untersuchen.
Das 89 kDa-große Spaltprodukt des DNA-Reparaturenzyms PARP wird vornehmlich von der aktivierten Effektorcaspase-3 im Rahmen beginnender Apoptose generiert und ist somit ein spezifischer Apoptosemarker (**Kaufmann** et al., 1993). Der Nachweis einer gesteigerten PARP-Spaltung in TE-671-Zellen nach einer 6-, 12- und 24-stündigen Behandlung mit ABT-263 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle diente als erster Hinweis auf eine ABT-induzierte Apoptose. Mittels Durchflusszytometrie konnte

anschließend eine ABT-263-vermittelte signifikante Aktivierung aller drei untersuchten Caspasen (-9, -8 und -3) in den TE-671-Zellen detektiert werden. Der stärkste Effekt von ABT-263 konnte beim intrinsischen Apoptosesignalweg beobachtet werden. Hier wurde die Aktivität der Initiatorcaspase-9 gemessen. Bereits nach 6 Stunden kam es zu einer signifikanten ABT-263-induzierten Steigerung der relativen Caspase-9-Aktivität um 39% ± 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt konnte durch eine längere Inkubationsdauer verstärkt werden. Die relative Caspase-9-Aktivität war nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 um 74% ± 23% signifikant gesteigert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese frühe und starke Caspase-9-Induktion erscheint nachvollziehbar, da der Bcl-2-Antagonist ABT-263 hauptsächlich in den intrinsischen Signalweg der Apoptose eingreift und diesen aktiviert. Hier begünstigt ABT-263 die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, welches gemeinsam mit der Initiatorcaspase-9 das Apoptosom bildet und die Apoptose in Gang setzt. Somit repräsentiert eine frühe Aktivierung von Caspase-9 die Induktion des intrinsischen Apoptosesignalwegs in TE-671-Zellen durch ABT-263.

Der Effekt von ABT-263 auf den extrinsischen Apoptosesignalweg setzte erst nach 24 Stunden der Behandlung ein. Die relative Aktivität von Initiatorcaspase-8 war um 59% ± 17% signifikant gesteigert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ein später ABT-263-induzierter Anstieg der Caspase-8-Aktivität lässt eine Mitaktivierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs durch den primär aktivierten intrinsischen Signalweg vermuten. Demnach könnte angenommen werden, dass in der RMS-Zelllinie TE-671 ein ABT-263-induzierter *Crosstalk* zwischen den beiden Signalwegen stattfindet. Weitere Untersuchungen zum Beweis dieser Hypothese sowie zur Identifizierung der Vermittler des angenommenen *Crosstalks* sind notwendig. Neben Caspase-8 ist außerdem Caspase-10 maßgeblich an der Fortleitung extrinsischer Apoptosestimuli in die Zelle beteiligt (**KISCHKEL** et al., 2001). Die Aktivierung von Caspase-10 muss in Ergänzung zu Caspase-8 im Rahmen der Behandlung mit ABT-263 weiter untersucht werden.

Eine Fortleitung proapoptotischer Stimuli in den TE-671-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden. Die Effektorcaspase-3 wird sowohl beim intrinsischen als auch beim extrinsischen Apoptosesignalweg aktiviert und stellt damit eine gemeinsame Endstrecke beider Signalwege dar (**RIEDL UND SHI**, 2004). Nach einer 24-stündigen Behandlung mit ABT-263 stieg die relative Caspase-3-Aktivität signifikant um 45% ± 9% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an.

Die durch FACS-Analysen erzielten Beobachtungen haben gezeigt, dass es zur ABT-263-induzierten Aktivierung von intrinsischer und extrinsischer Apoptose mit suffizienter Fortleitung in den TE-671-Zellen gekommen ist.

Obwohl die Hypothese einer stattfindenden Apoptose durch zwei unabhängige Verfahren belegt werden konnte, hatte eine 24-stündige Behandlung mit ABT-263 keine signifikante

Auswirkung auf das Überleben der TE-671-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den von Lock und Kollegen gelieferten Ergebnissen (**LOCK** et al., 2008). Sie untersuchten die Wirkung von ABT-263 auf eine Reihe von kindlichen Tumorzellen und befanden die TE-671-verwandte Zelllinie RD für nicht ABT-263-sensitiv. Daten zur ABT-263-Wirkung in TE-671-Zellen liegen dem Wissen der Autorin nach derzeit nicht vor. Wenngleich anhand der Literatur die Vermutung naheliegt, dass auch in der Zelllinie TE-671 eine Verlängerung der Inkubationsdauer zu keiner Änderung der Sensitivität gegenüber ABT-263 führen würde, so kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die nachgewiesenen Apoptosevorgänge nicht doch ein Absterben der TE-671-Zellen nach einer längeren Behandlungsdauer mit ABT-263 verursacht hätten. Hierzu sollten die Zellvitalitätsversuche in zukünftigen Studien um die Behandlungszeiträume von 48 und 96 Stunden ergänzt werden.
Diese Arbeit ist die erste, in der eine relative Resistenz von TE-671-Zellen gegenüber ABT-263 gezeigt werden konnte. Interessanterweise wurde jedoch die Eignung von ABT-263 für weitere Untersuchungen zur ARC-vermittelten Apoptose bestätigt, da diese Substanz in der Lage war, sowohl intrinsische als auch extrinsische Apoptosevorgänge in Gang zu setzten.

4.2 Eine Überexpression von Mcl-1 als möglicher Grund für die ABT-263-Resistenz von Rhabdomyosarkomzellen

Die Expression einzelner antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in maligne entarteten Zellen korreliert entscheidend mit ihrer Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika. Die Dominanz von einem oder zwei Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern ist charakteristisch für die jeweilige Zelllinie und wird in der Literatur als „Proteinabhängigkeit“ bezeichnet (**INOUE-YAMAUCHI** et al., 2017; **MERINO** et al., 2018).
In Anlehnung an die Hypothese zur „Proteinabhängigkeit“ wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Bcl-2- und Bcl-xL-Abhängigkeit der RMS-Zelllinie TE-671 durch den Einsatz des Bcl-2-Antagonisten ABT-263 überprüft. Die Expression der proapoptotischen Aktivatorproteine Bim und Bid, des Sensitiviererproteins PUMA sowie der Effektorproteine Bax und Bak wurde vor Beginn der ABT-Behandlung nachgewiesen. Sie stellt eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität des intrinsischen Bcl-2/Bcl-xL-Signalwegs dar. Angesichts der in Zellvitalitätsversuchen festgestellten Resistenz von TE-671-Zellen gegenüber einem Bcl-2/Bcl-xL-Antagonismus durch ABT-263 liegt die Vermutung nahe, dass ihr Überleben und somit auch ihre ausgeprägte Therapieresistenz nicht oder nicht nur von Bcl-2 und Bcl-xL abhängig sind. ABT-263 war zwar in der Lage,

Apoptosevorgänge in TE-671-Zellen zu induzieren, diese waren jedoch nicht suffizient, um die Zellen zum Absterben zu bringen.

ABT-263 bindet mit einer hohen Affinität an Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, jedoch nicht an ihren antiapoptotischen Verwandten Mcl-1 (**OLTERSDORF** et al., 2005). Ein Vergleich der Bcl-2- und Bcl-xL-Expression zwischen den mesenchymalen TE-671-Zellen und den epithelialen ClearCa-6 Zellen in dieser Arbeit lieferte den Hinweis auf eine relativ schwache Proteinexpression von Bcl-2 und Bcl-xL in TE-671-Zellen. Außerdem konnte für die untersuchte RMS-Zelllinie ein Trend dafür gezeigt werden, dass die Expression von Mcl-1 im Vergleich zu Bcl-2- und Bcl-xL gesteigert war. Die hier beobachtete Expressionssteigerung von Mcl-1 steht in Einklang mit der von Pazzaglia und Kollegen beobachteten Überexpression von Mcl-1 auf mRNA-Ebene in Proben von Patienten mit embryonalem Rhabdomyosarkom (**PAZZAGLIA** et al., 2009). Die Dominanz des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 beim intrinsischen Apoptosesignalweg der TE-671-Zellen könnte daher einen möglichen Grund für die Resistenz der RMS-Zellen gegenüber dem BH3-Mimetikum ABT-263 darstellen. Diese Hypothese stellten auch Preuss und Kollegen auf (**PREUSS** et al., 2013). Durch eine Herunterregulation der Expression von Mcl-1 konnten sie die Sensitivität von TE-671-Zellen gegenüber dem ABT-263-Vorgänger ABT-737 signifikant steigern. ABT-737 zeigt ein dem ABT-263 analoges Bindungsverhalten gegenüber antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern auf, ist jedoch als Medikament nicht oral verfügbar. Auch für andere Zelltypen wie die humanen Lymphom-, Zervix- oder Mammakarzinomzellen sowie das kleinzellige Bronchialkarzinom wurde bereits gezeigt, dass eine Herunterregulation der Mcl-1-Expression die Sensitivität gegenüber ABT-737 deutlich erhöhen konnte (**CHEN** et al., 2007; **TAHIR** et al., 2007; **VAN DELFT** et al., 2006; **YECIES** et al., 2010). Versuche mit einer herunterregulierten Mcl-1-Expression in TE-671-Zellen sind daher erforderlich, um seine resistenzvermittelnde Rolle bei der ABT-263-induzierten Apoptose in RMS-Zellen zu zeigen.

Innerhalb der Zelle bilden die antiapoptotischen Proteine Komplexe mit proapoptotischen BH3-*only*-Proteinen. Diesen Zustand beschreiben Certo und Kollegen in ihrer BH3-*Profiling*-Hypothese als „*priming*“ oder „Bereitschaft zum Sterben“ (**CERTO** et al., 2006; **MONTERO** und **LETAI**, 2018). Unter allen proapoptotischen BH3-*only*-Proteinen besitzt das Sensitiviererprotein Noxa das größte Potenzial an Mcl-1 zu binden und es zu neutralisieren (**CERTO** et al., 2006; **CHEN** et al., 2005). Dieser Prozess beruht wahrscheinlich auf einem durch Noxa vermittelten Abbau von Mcl-1 (**GOMEZ-BOUGIE** et al., 2011). Die Induktion von Noxa in ABT-737-resistenten, Mcl-1-überexprimierenden Jurkat-Zellen konnte ihre ABT-737-Resistenz teilweise aufheben und ihren Zelltod fördern (**ROOSWINKEL** et al., 2012). Die Expression von Noxa in RMS-Zellen konnte in dieser Arbeit nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die fehlende Inhibition durch Noxa könnte neben der Mcl-1-Überexpression in TE-671-Zellen eine mögliche Ursache für ihre

ABT-263-Resistenz darstellen. Diese Beobachtung sollte allerdings durch die Verwendung einer Positivkontrolle für Noxa im Western Blot gestützt werden. Aufgrund seiner extrem kurzen Halbwertszeit von 45-60 Minuten ist Noxa nur sehr schwer auf Proteinebene zu detektieren (**PANG** et al., 2014).

Neben dem endogenen Mcl-1-Inhibitor Noxa existieren bereits synthetisch hergestellte Mcl-1-Antagonisten wie das BH3-Mimetikum A-1210477 oder S63845 (**LEVERSON** et al., 2015; **KOTSCHY** et al., 2016). Wenngleich eine Monotherapie mit einem der Mcl-1-Antagonisten zu keinem vermehrten Zelltod bei Rhabdomyosarkomzellen führte, so konnte durch Kehr und Kollegen ein synergistischer Effekt von S63845 mit dem selektiven Bcl-xL-Inhibitor A-1331852 für die TE-671-verwandte Zelllinie RD sowie im Tiermodell des embryonalen RMS nachgewiesen werden (**KEHR** et al., 2020). Die Arbeitsgruppe um Kehr postuliert eine Co-Abhängigkeit der embryonalen Rhabdomyosarkomzellen RD von den antiapoptotischen Proteinen Bcl-xL und Mcl-1 und unterstreicht neben dieser Arbeit die Notwendigkeit zukünftiger Versuche zur Mcl-1-/Bcl-xL-Achse in TE-671-Zellen. Eine Regulation von Mcl-1 und Bcl-xL auf MicroRNA-Ebene ist nicht auszuschließen und wurde bereits in Osteosarkomzellen nachgewiesen (**JI** et al., 2013).

4.3 ARC reguliert den Mcl-1 S-Proteinspiegel in Rhabdomyosarkomzellen

Nachdem Mcl-1 als wichtigster Vertreter der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in TE-671-Zellen postuliert wurde, sollte die Rolle eines weiteren antiapoptotischen Proteins namens ARC (*apoptosis repressor with a CARD*) im Zellkulturmodell des embryonalen Rhabdomyosarkoms charakterisiert werden. ARC gehört nicht zur Familie der Bcl-2-Proteine. Als multimodaler Apoptoseinhibitor nimmt ARC sowohl Einfluss auf den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptosesignalweg, indem es an Bax, Bad, PUMA oder Caspase-8 bindet und diese hemmt (**GUSTAFSSON** et al., 2004; **LI** et al., 2008; **NAM** et al., 2004).

Zunächst wurde der Effekt eines ARC-*Knock-downs* auf die Expression von Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern in unbehandelten, d.h. überwiegend nicht-apoptotischen TE-671-Zellen untersucht. Im Western Blot zeigte sich tendenziell eine ARC-abhängige Herunterregulation der Expression von Mcl-1 S in ARC-*Knock-down*-Zellen im Vergleich zur *non-silencing*- und der untransduzierten Kontrolle. Das proapoptotische Protein Mcl-1 S entsteht durch alternatives *Splicing* des Mcl-1-Gens unter Aussparung von Exon 2. Das auf diese Weise exprimierte Protein ist mit einer Länge von 271 Aminosäuren kürzer als Mcl-1 L (L= *long*, S= *short*). Mcl-1 S weist im Gegensatz zu seiner längeren antiapoptotischen Isoform lediglich die BH3-Domäne auf, wobei die BH1- und

BH2-Domäne sowie transmembrane Domänen gänzlich fehlen. Untersuchungen in Hamsterzellen haben gezeigt, dass Mcl-1 S zur Dimerisierung mit Mcl-1 L neigt, wohingegen eine Bindung an andere Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie in Hefezellen nicht nachgewiesen werden konnte. Durch seine Bindung an Mcl-1 L wirkt das proapoptotische Mcl-1 S als eine Art endogener Mcl-1 L-Inhibitor (**BAE** et al., 2000; **BINGLE** et al., 2000).

Wie die Anhebung des Mcl-1 S-Proteinspiegels durch ARC oder sein Abbau nach einem ARC-*Knock-down* vollzogen werden, bedarf weiterer Klärung. Bisher war nicht bekannt, dass ARC die Expression oder den Abbau von Proteinen quantitativ beeinflussen kann. Außerdem handelt es sich hier um eine mögliche proapoptotische Wirkung von ARC, welche ebenfalls noch nicht bekannt war. Seine aktuell erforschten Wirkmechanismen sowohl bei der Apoptose als auch bei der Nekroptose waren auf eine direkte Bindung der entsprechenden Zielmoleküle und deren Inhibition zurückzuführen. Ein möglicher in der Natur existierender Mechanismus der Stabilisierung eines Proteins mit nachfolgendem Anstieg seiner Verfügbarkeit in der Zelle wäre zum einen die Inhibition seines Abbaus auf Proteinebene. Zum anderen könnte ein aktivierender Eingriff in seine Transkription auf DNA-Ebene oder die Translation auf mRNA-Ebene zu einer Steigerung des Proteinexpressionslevels führen. Diese Arbeit ist somit die erste, die eine Proteinspiegel-modulierende Wirkung als einen möglichen neuen Wirkmechanismus von ARC postuliert. Ein Einfluss von ARC auf Mcl-1 S wäre theoretisch sowohl auf der DNA- oder mRNA-Ebene als auch auf der Proteinebene möglich, da im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche die Lokalisation von ARC sowohl im zytoplasmatischen als auch im nukleären Zellkompartiment detektiert haben. Um einen Einfluss von ARC auf den Proteinspiegel von Mcl-1 S zu quantifizieren, müssen die in dieser Arbeit erhobenen Daten durch densitometrische Auswertungen der Proteinexpression gestützt werden. Weitere Experimente zur Klärung der Frage, auf welche Weise ARC die Expression von Mcl-1 S beeinflusst, sind in Zukunft notwendig, um die Rolle von ARC in mesenchymalen Tumoren besser verstehen und somit auch gezielt therapeutisch ausnutzen zu können.

Im Gegensatz zu Mcl-1 S war die Expression der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax, Bak, Box, PUMA, Bid und Bim in unbehandelten TE-671-Zellen nicht abhängig von ARC. Auf die Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 L hatte ARC ebenfalls keinen Einfluss. Vor allem die Expression von Mcl-1 L, aber auch in geringerem Maße von Bcl-2 und Bcl-xL, stieg nach einer Transduktion mit lentiviraler shRNA an und war sowohl in der ARC-*Knock-down*- als auch in der *non-silencing*-Gruppe tendenziell erhöht. Diese Ergebnisse lassen eine Aktivierung der Mcl-1 L-dominierten antiapoptotischen Achse in TE-671-Zellen durch das Einbringen von lentiviralen Vektoren vermuten. Vermutlich hat der Vorgang der Transduktion eine Stressreaktion in TE-671-Zellen hervorgerufen,

welche durch die Hochregulation von überlebensfördernden Bcl-2-Proteinen beantwortet wurde. Eine mögliche Reaktion auf die Transduktion könnte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) darstellen. Die stressbedingte Hochregulation der Mcl-1-Expression durch NF-κB konnte bereits für zahlreiche Tumorarten beobachtet werden und könnte im RMS eine wichtige Rolle spielen (**GRAHAM** et al., 2013; **BHARADWAJ** et al., 2011; **HERTLEIN** et al., 2008).

4.4 Ein Knock-down von ARC hebt die ABT-263-Resistenz von Rhabdomyosarkomzellen nicht auf

Mithilfe des bereits beschriebenen Bcl-2-Antagonisten ABT-263 sollte die Apoptose in TE-671-Zellen induziert werden, um die Rolle von ARC beim intrinsischen Apoptosesignalweg zu untersuchen. Zuvor wurde gezeigt, dass das BH3-Mimetikum ABT-263 dafür geeignet ist, Apoptosevorgänge sowohl auf intrinsischem als auch extrinsischem Wege in untransduzierten RMS-Zellen anzustoßen. Trotz aktivierter Apoptosesignalwege zeigte sich die RMS-Zelllinie TE-671 resistent gegenüber ABT-263 und es kam zu keinem signifikanten Zelltod nach 24-stündiger Behandlung mit dem Bcl-2-Antagonisten.

Die Expression von ARC in TE-671-Zellen wurde stabil herunterreguliert und die Zellen wurden anschließend mit ABT-263 behandelt. Analysen der PARP-Spaltung zeigten sowohl für die ARC-*Knock-down*- als auch für die *non-silencing*-Kontrollzellen eine ABT-263-induzierte Apoptoseaktivierung bereits nach 6 und auch nach 12 und 24 Stunden. Die densitometrische Auswertung der Expression des PARP-Spaltungsprodukts wurde nicht durchgeführt, da die Versuche zweimal wiederholt wurden. Die Expression sollte daher durch weitere Versuchswiederholungen quantifiziert werden, um einen möglichen zeitabhängigen Anstieg des PARP-Spaltprodukts zu identifizieren.

Trotz nachgewiesener ABT-induzierter Apoptose konnte ein *Knock-down* von ARC die zuvor beobachtete, wahrscheinlich Mcl-1-vermittelte ABT-Resistenz der TE-671-Zellen nicht aufheben. Zu keinem Zeitpunkt der Behandlung mit ABT-263 kam es in den ARC-*Knock-down*-Zellen zu einem signifikanten Rückgang der Lebendzellzahl verglichen mit ihrer unbehandelten oder der *non-silencing*-Kontrolle. Nach einem *Knock-down* von ARC, jedoch nicht in den beiden Kontrollzellgruppen, zeichnete sich bei langer Inkubationsdauer von 24 Stunden allenfalls ein Trend hin zur erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber ABT-263 ab. Messungen der Zellvitalität nach einer 48- und 72-stündigen Behandlung mit ABT-263 müssen in Zukunft ergänzend durchgeführt werden, um diesen Trend näher zu untersuchen.

Ein Einfluss von ARC auf die ABT-induzierte Caspaseaktivierung in RMS-Zellen konnte in dieser Arbeit nicht sicher geklärt werden. Obwohl eine Aktivierung der apoptotischen Endstrecke mittels PARP-Spaltungsanalysen nachgewiesen wurde, konnte in den transduzierten TE-671-Zellen weder für den intrinsischen noch für den extrinsischen Apoptosesignalweg eine signifikante Initiatorcaspasenaktivierung nach einer ABT-Behandlung beobachtet werden. Lediglich für Caspase-3, ein Enzym der apoptotischen Endstrecke, kam es nach 24-stündiger Behandlung mit ABT-263 zu einem signifikanten ARC-abhängigen Aktivitätsanstieg um 17% ± 10% im Vergleich zur *non-silencing*-Kontrolle. Der ABT-263-induzierte Effekt fiel in den ARC-*Knock-down*-Zellen jedoch um 32% ± 10% geringer aus als in den untransduzierten RMS-Zellen. Vor allem nach der 24-stündigen Behandlung mit ABT-263 bestand zwischen der untransduzierten Zellgruppe auf der einen Seite und den beiden transduzierten TE-671-Zellgruppen auf der anderen Seite ein großer Unterschied in der Aktivität aller drei Caspasen (-9, -8 und -3). Offensichtlich wurde allein durch die Transduktion der Zellen die Detektion ihrer Caspaseaktivität erschwert. In dieser Arbeit konnte eine ABT-263-induzierte PARP-Spaltung und somit eine stattfindende Apoptose in allen verwendeten Zellgruppen, inklusive der transduzierten Zellen, nachgewiesen werden. Außerdem ist ABT-263 ein Induktor des intrinsischen Apoptosesignalwegs, dessen Schlüsselenzym Caspase-9 darstellt. Eine Aktivierung der Caspase-9 muss folgerichtig, wie in den untransduzierten RMS-Zellen beobachtet, auch in den ARC-*Knock-down*- und *non-silencing*-Zellen stattgefunden haben. Somit könnte man möglicherweise darauf schließen, dass der Transduktionsvorgang per se zu einer erschwerten Caspaseaktivitätsdetektion mittels Durchflusszytometrie in den RMS-Zellen geführt hat. Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zur Caspaseaktivität in analog transduzierten Nierenkarzinomzellen zeigten hingegen keine Detektionsschwierigkeiten in der Durchflusszytometrie (**Toth** et al., 2017). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der beobachtete Effekt möglichweise zelllinienspezifisch war. Alternative Untersuchungen wie beispielsweise ein Western Blot mit Nachweis einer Caspasespaltung sind notwendig, um die ABT-induzierte Caspaseaktivität in Abhängigkeit von ARC messen zu können.

Die ABT-Resistenz von untransduzierten TE-671-Zellen wurde in dieser Arbeit auf ihre mögliche Überexpression des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 zurückgeführt. Anschließende Western-Blot-Versuche mit ARC-*Knock-down*-Zellen haben keinen Hinweis dafür geliefert, dass ARC einen Einfluss auf die Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder in unbehandelten RMS-Zellen nimmt. Folglich konnte die Mcl-1-Überexpression der TE-671-Zellen, welche wahrscheinlich für die ABT-Resistenz mit verantwortlich war, nicht durch ARC reduziert werden. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Transduktion der TE-671-Zellen mit lentiviraler shRNA zu einem tendenziellen Anstieg der Mcl-1-Expression sowohl in ARC-*Knock-down*- als auch in

non-silencing-Zellen geführt hat. Darüber hinaus konnten Wang und Kollegen zeigen, dass eine Behandlung von Tumorzellen mit ABT-263 zu einem Anstieg von Mcl-1 auf mRNA- und Proteinebene führt (**WANG** et al., 2014). Zukünftige Quantifizierungen der Mcl-1-Expression nach ABT-Behandlung und ARC-*Knock-down* wären notwendig, um eine mögliche Einflussnahme von ARC und Mcl-1 in RMS-Zellen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang bleibt zu klären, welchen Einfluss die in dieser Arbeit beobachtete ARC-abhängige Regulation des proapoptotischen Proteins Mcl-1-S auf den intrinsischen Apoptosesignalweg in TE-671-Zellen hat.
Diese Arbeit ist die erste, in der ein mögliches Zusammenwirken von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern und dem antiapoptotischen Protein ARC untersucht wurde. Es wurden erste Hinweise für einen fehlenden Synergismus zwischen ARC und Bcl-2 sowie Bcl-xL entdeckt. Dies basiert wahrscheinlich auf einer Dominanz des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 in der embryonalen RMS-Zelllinie TE-671.

4.5 Ein Knock-down von ARC hebt die TRAIL-Resistenz von Rhabdomyosarkomzellen auf

Der *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) ist ein potenter endogen exprimierter Induktor extrinsischer Apoptose in Tumorzellen (**WILEY** et al., 1995). Nach seiner Bindung an die zellmembranständigen Todesrezeptoren (*death receptors*) DR4 und DR5 kommt es mittels FADD und Caspase-8 zur Weiterleitung des proapoptotischen Signals in die Zelle (**KISCHKEL** et al., 2000; **PAN** et al., 1997; **WALCZAK** et al., 1997). Aufgrund seiner geringen Toxizität im Normalgewebe und der guten Wirksamkeit in Tumorzellen stellte sich rekombinant hergestelltes TRAIL in präklinischen Zell- und Tierversuchen als ein zukunftsträchtiges Krebstherapeutikum heraus (**ASHKENAZI** et al., 1999). Zusätzlich wurden monoklonale Antikörper mit agonistischer Wirkung an DR4- und DR5-Rezeptoren entwickelt, wobei vor allem DR5-Agonisten eine gute Wirksamkeit unter anderem auch in Rhabdomyosarkomzellen zeigten (**KANG** et al., 2011; **TOLCHER** et al., 2007). Die Anwendung von TRAIL-agonistischen Substanzen lieferte im Rahmen erster klinischer Studien vornehmlich in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika positive Ergebnisse mit geringer Rate an Nebenwirkungen (**HELLWIG** und **REHM**, 2012). Ihre klinische Wirksamkeit in Kombination mit Standardtherapeutika konnte jedoch bisher nicht sicher auf einen Überlebensvorteil schließen lassen (**SUN** et al., 2014; **OUYANG** et al., 2018; **DENG** und **SHAH**, 2020). Dies könnte unter anderem in der unzureichenden Quervernetzung von TRAIL-Rezeptoren durch ihre synthetisch hergestellten Liganden begründet sein (**GIEFFERS** et al., 2013; **NAIR** et al., 2015).

Ergänzend zu ARC-Versuchen bei intrinsisch initiierter Apoptose wurde die Rolle von ARC auch im Rahmen des extrinsischen Apoptosesignalwegs in RMS-Zellen analysiert. Die extrinsische Apoptose wurde mithilfe von Super*Killer*TRAIL (nachfolgend: TRAIL) induziert. Die Expression des DR5-Todesrezeptors in TE-671-Zellen konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden. Hier bestand zwar kein eindeutiger Unterschied zwischen ARC-*Knock-down*- und *non-silencing*-Zellen, jedoch war die DR5-Expression im RMS deutlich höher als in der epithelialen Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6. Die Expression des TRAIL-Rezeptors DR4 in TE-671-Zellen konnte nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden. Für die TE-671-verwandte Zelllinie RD konnte in anderen Arbeiten ein ebenfalls sehr schwaches oder sogar fehlendes Expressionssignal von DR4 auf Protein- bzw. mRNA-Ebene gezeigt werden (**KANG** et al., 2011; **SMITH** et al., 2010). Demnach kann angenommen werden, dass der zytotoxische Effekt von TRAIL in TE-671-Zellen wahrscheinlich über DR5- und nicht über DR4-Rezeptoren vermittelt wird. Eine Überprüfung dieser Hypothese sollte im Western Blot mittels Verwendung einer Positivkontrolle für DR4 durchgeführt werden. Zusätzliche DR5-*Knock-down*-Versuche könnten die Annahme einer DR5-Dominanz belegen.

Anders als von Klüttermann und Kollegen zuvor beobachtet, offenbarte der Einsatz von Super*Killer*TRAIL in dieser Arbeit eine TRAIL-Resistenz untransduzierter RMS-Zellen (**KLÜTTERMANN** et al., 2006). Angesichts dieser Diskrepanzen mit publizierten Daten sollte jedoch beachtet werden, dass die von Klüttermann eingesetzte TRAIL-Substanz mit einem *Enhancer* kombiniert und der zytotoxische Effekt mit anderen Methoden nachgewiesen wurde. Insofern ist eine 100%-ige Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse nicht gegeben.

In dieser Arbeit kam es weder in der untransduzierten noch in der *non-silencing*-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem signifikanten Rückgang der Lebendzellzahl nach 24-stündiger Behandlung mit TRAIL. Interessanterweise konnte die TRAIL-Resistenz von TE-671-Zellen mithilfe eines ARC-*Knock-downs* überwunden werden. Hier kam es zu einem signifikanten, dosisabhängigen TRAIL-induzierten Rückgang vitaler Zellen um 20% ± 7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von ARC-*Knock-down*-Zellen. Vorangegangene Analysen der Expression des PARP-Spaltungsprodukts lieferten den Hinweis darauf, dass es sich bei dem beobachteten Zelltod um Apoptose handelte. Mittels TRAIL ließ sich in allen untersuchten Zellgruppen Apoptose induzieren, welche tendenziell dosisabhängig war. Für keine der verwendeten TRAIL-Konzentrationen konnte jedoch ein signifikanter Unterschied der Lebendzellzahl zwischen den ARC-*Knock-down* und den *non-silencing*-Zellen gesichert werden. Nach einer Behandlung mit 100 ng/ml skTRAIL konnte jedoch ein Trend hin zu einer um 11% ± 7% geringeren Lebendzellzahl in den ARC-*Knock-down*-Zellen verglichen mit *non-silencing*-Zellen beobachtet werden ($p = 0{,}079$). Diese Ergebnisse sprechen für eine

wahrscheinlich ARC-abhängige TRAIL-Resistenz embryonaler RMS-Zellen. Die Herunterregulation von ARC führte hier zu einem vermehrten Zellsterben, nicht jedoch die alleinige Applikation von TRAIL. Die Aussagekraft der durchgeführten Versuche sollte jedoch durch eine höhere Wiederholungszahl weiter bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind die ersten dieser Art, die einen möglichen Einfluss des antiapoptotischen Proteins ARC auf den TRAIL-assoziierten extrinsischen Apoptosesignalweg vermuten lassen. Weitere Untersuchungen sind in Zukunft notwendig, um diese Annahme zu bestätigen. So sollte durch zusätzliche Apoptoseversuche eindeutig geklärt werden, ob es zu einer ARC-abhängigen Caspaseaktivierung nach einer TRAIL-Induktion in TE-671-Zellen kommt und durch welche Wirkmechanismen diese vermittelt wird. Eine mögliche Induktion von Nekroptose durch TRAIL ist von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt worden und ist für TE-671-Zellen zu untersuchen (**JOUAN-LANHOUET** et al., 2012).

5 Literaturverzeichnis

Abmayr, S., Crawford, R.W., Chamberlain, J.S., 2004. Characterization of ARC, apoptosis repressor interacting with CARD, in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. Hum. Mol. Genet. 13, 213–221. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh018

Adachi, M., Tefferi, A., Greipp, P.R., Kipps, T.J., Tsujimoto, Y., 1990. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. J. Exp. Med. 171, 559–564.

Adams, J.M., Cory, S., 2018. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. Cell Death Differ. 25, 27–36. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.161

Adams, J.M., Cory, S., 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281, 1322–1326.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. Cell 87, 171. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81334-3

Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C., 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat. Med. 3, 917–921.

Amgen, 2020. A Phase 2 Open Label Extension Study of Conatumumab and AMG 479 (Clinical trial registration No. study/NCT01327612). clinicaltrials.gov.

Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., Fornace, A.J., 2000. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. Cancer Res. 60, 6101–6110.

An, J., Harms, C., Lättig-Tünnemann, G., Sellge, G., Mandić, A.D., Malato, Y., Heuser, A., Endres, M., Trautwein, C., Donath, S., 2012. TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure. Hepatol. Baltim. Md 56, 715–726. https://doi.org/10.1002/hep.25697

An, J., Li, P., Li, J., Dietz, R., Donath, S., 2009. ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. J. Mol. Med. 87, 401–410. https://doi.org/10.1007/s00109-008-0434-z

An, J., Mehrhof, F., Harms, C., Lättig-Tünnemann, G., Lee, S.L.L., Endres, M., Li, M., Sellge, G., Mandić, A.D., Trautwein, C., Donath, S., 2013. ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. J. Hepatol. 58, 297–305. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.002

Aranovich, A., Liu, Q., Collins, T., Geng, F., Dixit, S., Leber, B., Andrews, D.W., 2012. Differences in the Mechanisms of Proapoptotic BH3 Proteins Binding to Bcl-XL and Bcl-2 Quantified in Live MCF-7 Cells. Mol. Cell 45, 754–763. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.030

Armistead, P.M., Salganick, J., Roh, J.S., Steinert, D.M., Patel, S., Munsell, M., El-Naggar, A.K., Benjamin, R.S., Zhang, W., Trent, J.C., 2007. Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients. Cancer 110, 2293–2303. https://doi.org/10.1002/cncr.23038

Arndt, C.A.S., Stoner, J.A., Hawkins, D.S., Rodeberg, D.A., Hayes-Jordan, A.A., Paidas, C.N., Parham, D.M., Teot, L.A., Wharam, M.D., Breneman, J.C., Donaldson, S.S., Anderson, J.R., Meyer, W.H., 2009. Vincristine, actinomycin, and cyclophosphamide compared with vincristine, actinomycin, and cyclophosphamide alternating with vincristine, topotecan, and cyclophosphamide for intermediate-risk rhabdomyosarcoma: children's oncology group study D9803. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 27, 5182–5188. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.3768

Ashkenazi, A., 2015. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. J. Clin. Invest. 125, 487–489. https://doi.org/10.1172/JCI80420

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., Schwall, R.H., 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J. Clin. Invest. 104, 155–162. https://doi.org/10.1172/JCI6926

Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J., 2000. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. J. Biol. Chem. 275, 25255–25261. https://doi.org/10.1074/jbc.M909826199

Basit, F., Cristofanon, S., Fulda, S., 2013. Obatoclax (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. Cell Death Differ. 20, 1161–1173. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.45

Berger, D.P., Engelhardt, R., Mertelsmann, R. (Eds.), 2014. Das Rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie ; [E-Book inklusive], 5., überarb. und erw. Aufl. ed, ecomed Medizin. Ecomed Medizin, Heidelberg ;Hamburg.

Beverly Raney, R., Walterhouse, D.O., Meza, J.L., Andrassy, R.J., Breneman, J.C., Crist, W.M., Maurer, H.M., Meyer, W.H., Parham, D.M., Anderson, J.R., 2011. Results of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group D9602 Protocol, Using Vincristine and Dactinomycin With or Without Cyclophosphamide and Radiation Therapy, for Newly Diagnosed Patients With Low-Risk Embryonal Rhabdomyosarcoma: A Report From the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. J. Clin. Oncol. 29, 1312–1318. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.4469

Bharadwaj, U., Marin-Muller, C., Li, M., Chen, C., Yao, Q., 2011. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-α-induced apoptosis through Akt/PI3K/NF-κB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. Mol Cancer 10, 106. https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-106

Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P., Whyte, M.K., 2000. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. J. Biol. Chem. 275, 22136–22146. https://doi.org/10.1074/jbc.M909572199

Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.-E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., Salvesen, G.S., 2003. A Unified Model for Apical Caspase Activation. Mol. Cell 11, 529–541. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00051-0

Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Höfler, G., Kreipe, H., Moch, H. (Eds.), 2012. Pathologie: mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript], 5., vollst. überarb. Aufl. ed. Elsevier, Urban & Fischer, München.

Bonner, W.A., Hulett, H.R., Sweet, R.G., Herzenberg, L.A., 1972. Fluorescence activated cell sorting. Rev. Sci. Instrum. 43, 404–409.

Bouma, W., Noma, M., Kanemoto, S., Matsubara, M., Leshnower, B.G., Hinmon, R., Gorman, J.H., Gorman, R.C., 2010. Sex-related resistance to myocardial ischemia-reperfusion injury is associated with high constitutive ARC expression. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 298, H1510-1517. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01021.2009

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Breneman, J.C., Lyden, E., Pappo, A.S., Link, M.P., Anderson, J.R., Parham, D.M., Qualman, S.J., Wharam, M.D., Donaldson, S.S., Maurer, H.M., Meyer, W.H., Baker, K.S., Paidas, C.N., Crist, W.M., 2003. Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 21, 78–84. https://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.129

Bühling, K.J., Lepenies, J., Witt, K. (Eds.), 2008. Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie: [mit dem Plus im Web; Zugangscode im Buch], 4., aktualisierte Aufl. ed, Klinik. Elsevier, Urban & Fischer, München.

Camidge, D., Herbst, R.S., Gordon, M., Eckhardt, S., Kurzroc, R., Durbin, B., Ing, J., Ling, J., Sager, J., Mendelson, D., 2007. A phase I safety and pharmacokinetic study of apomab, a human DR5 agonist antibody, in patients with advanced cancer. ASCO Meet. Abstr. 25, 3582.

Carter, B.Z., Qiu, Y.H., Zhang, N., Coombes, K.R., Mak, D.H., Thomas, D.A., Ravandi, F., Kantarjian, H.M., Koller, E., Andreeff, M., Kornblau, S.M., 2011. Expression of ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain), an antiapoptotic protein, is strongly prognostic in AML. Blood 117, 780–787. https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-280503

Cavazzana, A.O., Schmidt, D., Ninfo, V., Harms, D., Tollot, M., Carli, M., Treuner, J., Betto, R., Salviati, G., 1992. Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. Am. J. Surg. Pathol. 16, 229–235.

Certo, M., Moore, V.D.G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., Letai, A., 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. Cancer Cell 9, 351–365. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. Mol. Cell 17, 393–403. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.030

Chen, L.H., Jiang, C.C., Watts, R., Thorne, R.F., Kiejda, K.A., Zhang, X.D., Hersey, P., 2008. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of melanoma cells by the ARC protein. Cancer Res. 68, 834–842. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5056

Chen, S., Dai, Y., Harada, H., Dent, P., Grant, S., 2007. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. Cancer Res. 67, 782–791. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3964

Chen, T.R., Dorotinsky, C., Macy, M., Hay, R., 1989. Cell identity resolved. Nature 340, 106–106. https://doi.org/10.1038/340106b0

Chen, W., Li, N., Chen, T., Han, Y., Li, C., Wang, Y., He, W., Zhang, L., Wan, T., Cao, X., 2005. The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) and FYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway. J. Biol. Chem. 280, 40985–40995. https://doi.org/10.1074/jbc.M502190200

Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem. J. 326, 1–16.

Coindre, J.M., Trojani, M., Contesso, G., David, M., Rouesse, J., Bui, N.B., Bodaert, A., De Mascarel, I., De Mascarel, A., Goussot, J.F., 1986. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. Cancer 58, 306–309.

Compton, S.J., Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal. Biochem. 151, 369–374. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3

Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) of the Gesellschaft für, Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) of the Gesellschaft für, 2012. CWS-Guidance for risk adapted treatment of soft tissue sarcoma and soft tissue tumours in children, adolescents, and young adults.

Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat. Rev. Cancer 2, 647–656. https://doi.org/10.1038/nrc883

Dai, Z., Zhu, W.-G., Morrison, C.D., Brena, R.M., Smiraglia, D.J., Raval, A., Wu, Y.-Z., Rush, L.J., Ross, P., Molina, J.R., Otterson, G.A., Plass, C., 2003. A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. Hum. Mol. Genet. 12, 791–801. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg083

Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Robert Datta, S., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., Gygi, S.P., Korsmeyer, S.J., 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. Nature 424, 952–956. https://doi.org/10.1038/nature01825

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., 1997. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. Cell 91, 231–241. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5

Davicioni, E., Anderson, M.J., Finckenstein, F.G., Lynch, J.C., Qualman, S.J., Shimada, H., Schofield, D.E., Buckley, J.D., Meyer, W.H., Sorensen, P.H.B., Triche, T.J., 2009. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. Am. J. Pathol. 174, 550–564. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080631

Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A., Barr, F.G., 1994. Fusion of PAX7 to FKHR by the Variant t(1;13)(p36;q14) Translocation in Alveolar Rhabdomyosarcoma. Cancer Res. 54, 2869–2872

Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., Hinds, M.G., 2005. Solution Structure of Prosurvival Mcl-1 and Characterization of Its Binding by Proapoptotic BH3-only Ligands. J. Biol. Chem. 280, 4738–4744. https://doi.org/10.1074/jbc.M411434200

Deng, D., Shah, K., 2020. TRAIL of Hope Meeting Resistance in Cancer. Trends Cancer 6, 989–1001. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.06.006

Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M., Letai, A., 2007. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. Cancer Cell 12, 171–185. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.001

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. EMBO J. 17, 2215–2223. https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2215

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature 388, 300–304. https://doi.org/10.1038/40901

Dickens, L.S., Powley, I.R., Hughes, M.A., MacFarlane, M., 2012. The ‘complexities’ of life and death: Death receptor signalling platforms. Exp. Cell Res., Special Issue - Cell Death 318, 1269–1277. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.04.005

Donath, S., Li, P., Willenbockel, C., Al-Saadi, N., Gross, V., Willnow, T., Bader, M., Martin, U., Bauersachs, J., Wollert, K.C., Dietz, R., Harsdorf, R. von, Network, on behalf of the G.H.F., 2006. Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain Is Required for Cardioprotection in Response to Biomechanical and Ischemic Stress. Circulation 113, 1203–1212. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576785

Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., Scott, F.L., 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep. 7, 988–994. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400795

Ekhterae, D., Hinmon, R., Matsuzaki, K., Noma, M., Zhu, W., Xiao, R.-P., Gorman, R.C., Gorman, J.H., 2011. Infarction induced myocardial apoptosis and ARC activation. J. Surg. Res. 166, 59–67. https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.002

Ekhterae, D., Lin, Z., Lundberg, M.S., Crow, M.T., Brosius, F.C., Núñez, G., 1999. ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. Circ. Res. 85, e70-77

Engidawork, E., Gulesserian, T., Yoo, B.C., Cairns, N., Lubec, G., 2001. Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer’s disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 84–93. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4306

Enzo Scientific, n.d. SuperKillerTRAIL™ (soluble) (human), (recombinant) - ALX-201-115 - Enzo Life Sciences [WWW Document]. URL http://www.enzolifesciences.com/ALX-201-115/superkillertrail-soluble-human-recombinant/ (accessed 18.02.23)

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol. Baltim. Md 1950 148, 2207–2216.

Faqar-Uz-Zaman, S.F., Heinicke, U., Meister, M.T., Vogler, M., Fulda, S., 2018. BCL-xL-selective BH3 mimetic sensitizes rhabdomyosarcoma cells to chemotherapeutics by activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. Cancer Lett. 412, 131–142. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.025

Farrow, S.N., Brown, R., 1996. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 45–49. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)90009-X

Fletcher, C.D.M., World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (Eds.), 2013. WHO classification of tumours of soft tissue and bone, 4th ed. ed, World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon.

Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., Jäättelä, M., 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. J. Cell Biol. 153, 999–1010.

Folpe, A.L., Inwards, C.Y. (Eds.), 2010. Bone and soft tissue pathology: [expert consult activate at expertconsult.com, searchable full text online], Foundations in diagnostic pathology. Elsevier, Saunders, Philadelphia, Pa.

Foo, R.S.-Y., Chan, L.K.W., Kitsis, R.N., Bennett, M.R., 2007a. Ubiquitination and Degradation of the Anti-apoptotic Protein ARC by MDM2. J. Biol. Chem. 282, 5529–5535. https://doi.org/10.1074/jbc.M609046200

Foo, R.S.-Y., Nam, Y.-J., Ostreicher, M.J., Metzl, M.D., Whelan, R.S., Peng, C.-F., Ashton, A.W., Fu, W., Mani, K., Chin, S.-F., Provenzano, E., Ellis, I., Figg, N., Pinder, S., Bennett, M.R., Caldas, C., Kitsis, R.N., 2007b. Regulation of p53 tetramerization and nuclear export by ARC. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 20826–20831. https://doi.org/10.1073/pnas.0710017104

Friesen, C., Fulda, S., Debatin, K.M., 1997. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. Leukemia 11, 1833–1841

Fulda, S., 2008. Targeting apoptosis resistance in rhabdomyosarcoma. Curr. Cancer Drug Targets 8, 536–544. https://doi.org/10.2174/156800908785699333

Galili, N., Davis, R.J., Fredericks, W.J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F.J., Emanuel, B.S., Rovera, G., Barr, F.G., 1993. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. Nat. Genet. 5, 230–235. https://doi.org/10.1038/ng1193-230

Gandhi, L., Camidge, D.R., Oliveira, M.R. de, Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C.L., McKeegan, E.M., Litvinovich, E., Hemken, P.M., Dive, C., Enschede, S.H., Nolan, C., Chiu, Y.-L., Busman, T., Xiong, H., Krivoshik, A.P., Humerickhouse, R., Shapiro, G.I., Rudin, C.M., 2011. Phase I Study of Navitoclax (ABT-263), a Novel Bcl-2 Family Inhibitor, in Patients With Small-Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors. J. Clin. Oncol. 29, 909–916. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.6208

Ganten, D., Ruckpaul, K., Aretz, S., Ganten-Ruckpaul (Eds.), 2008. Grundlagen der molekularen Medizin: mit 28 Tabellen, 3., überarb. und erw. Aufl. ed. Springer Medizin, Heidelberg.

Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Bellairs, J.A., Leshchiner, E.S., Walensky, L.D., 2012. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. Nat. Chem. Biol. 8, 639–645. https://doi.org/10.1038/nchembio.995

Gieffers, C., Kluge, M., Merz, C., Sykora, J., Thiemann, M., Schaal, R., Fischer, C., Branschädel, M., Abhari, B.A., Hohenberger, P., Fulda, S., Fricke, H., Hill, O., 2013. APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. Mol. Cancer Ther. 12, 2735–2747. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0323

Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 280, 14507–14513. https://doi.org/10.1074/jbc.M414425200

Gomez-Bougie, P., Ménoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2011. Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 413, 460–464. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.118

Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J., Shore, G.C., 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. J. Cell Biol. 143, 207–215.

Gracia, E., Fernandez-Belda, F., 1992. Ponceau S as a dye for quantitative protein assay. Its use in the presence of Triton X-100. Biochem. Int. 27, 725–733

Graham, C., Matta, H., Yang, Y., Yi, H., Suo, Y., Tolani, B., Chaudhary, P.M., 2013. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus oncoprotein K13 protects against B cell receptor-induced growth arrest and apoptosis through NF-κB activation. J Virol 87, 2242–2252. https://doi.org/10.1128/JVI.01393-12

Green, D.R., Llambi, F., 2015. Cell Death Signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a006080. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080

Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Yin, X.-M., Gores, G.J., 2005. Bid Is Upstream of Lysosome-Mediated Caspase 2 Activation in Tumor Necrosis Factor α–Induced Hepatocyte Apoptosis. Gastroenterology 129, 269–284. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.022

Gustafsson, A.B., Sayen, M.R., Williams, S.D., Crow, M.T., Gottlieb, R.A., 2002. TAT protein transduction into isolated perfused hearts: TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective. Circulation 106, 735–739.

Gustafsson, Å.B., Tsai, J.G., Logue, S.E., Crow, M.T., Gottlieb, R.A., 2004. Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain Protects against Cell Death by Interfering with Bax Activation. J. Biol. Chem. 279, 21233–21238. https://doi.org/10.1074/jbc.M400695200

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. Cell 100, 57–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9

Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., Korsmeyer, S.J., 2004. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 15313–15317. https://doi.org/10.1073/pnas.0406837101

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M., 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 387, 296–299. https://doi.org/10.1038/387296a0

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. J. Biol. Chem. 277, 432–438. https://doi.org/10.1074/jbc.M109721200

Heikaus, S., Kempf, T., Mahotka, C., Gabbert, H.E., Ramp, U., 2008. Caspase-8 and its inhibitors in RCCs in vivo: the prominent role of ARC. Apoptosis 13, 938–949. https://doi.org/10.1007/s10495-008-0225-6

Hellwig, C.T., Rehm, M., 2012. TRAIL Signaling and Synergy Mechanisms Used in TRAIL-Based Combination Therapies. Mol. Cancer Ther. 11, 3–13. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0434

Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770–776. https://doi.org/10.1038/35037710

Hertlein, E.K., West, D.A., Craig, R.W., Lucas, D.M., Byrd, J.C., 2008. NF-κB Is Active in Mcl-1 Promoter Regulation in Human CLL. Blood 112, 2265–2265. https://doi.org/10.1182/blood.V112.11.2265.2265

Hinds, M.G., Lackmann, M., Skea, G.L., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., Day, C.L., 2003. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. EMBO J. 22, 1497–1507. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg144

Hong, Y.-M., Jo, D.-G., Lee, J.-Y., Chang, J.-W., Nam, J.-H., Noh, J.Y., Koh, J.-Y., Jung, Y.-K., 2003. Down-regulation of ARC contributes to vulnerability of hippocampal neurons to ischemia/hypoxia. FEBS Lett. 543, 170–173. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00444-7

Houghton, P.J., Morton, C.L., Gorlick, R., Kolb, E.A., Keir, S.T., Reynolds, C.P., Kang, M.H., Maris, J.M., Wu, J., Smith, M.A., 2010. Initial Testing of a Monoclonal Antibody (IMC-A12) Against IGF-1R by the Pediatric Preclinical Testing Program. Pediatr. Blood Cancer 54, 921–926. https://doi.org/10.1002/pbc.22367

https://www.selleckchem.com/products/ABT-263.html [WWW Document], selleckchem.com. URL https://www.selleckchem.com/products/ABT-263.html (accessed 28.01.21)

Huang, K., O'Neill, K.L., Li, J., Zhou, W., Han, N., Pang, X., Wu, W., Struble, L., Borgstahl, G., Liu, Z., Zhang, L., Luo, X., 2019. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. Cell Res. 29, 942–952. https://doi.org/10.1038/s41422-019-0231-y

Hughes, M.A., Harper, N., Butterworth, M., Cain, K., Cohen, G.M., MacFarlane, M., 2009. Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival. Mol. Cell 35, 265–279. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.012

Imoto, I., Yang, Z.Q., Pimkhaokham, A., Tsuda, H., Shimada, Y., Imamura, M., Ohki, M., Inazawa, J., 2001. Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer Res. 61, 6629–6634

Inoue-Yamauchi, A., Jeng, P.S., Kim, K., Chen, H.-C., Han, S., Ganesan, Y.T., Ishizawa, K., Jebiwott, S., Dong, Y., Pietanza, M.C., Hellmann, M.D., Kris, M.G., Hsieh, J.J., Cheng, E.H., 2017. Targeting the differential addiction to anti-apoptotic BCL-2 family for cancer therapy. Nat. Commun. 8, 16078. https://doi.org/10.1038/ncomms16078

Iqbal, J., Sanger, W.G., Horsman, D.E., Rosenwald, A., Pickering, D.L., Dave, B., Dave, S., Xiao, L., Cao, K., Zhu, Q., Sherman, S., Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Delabie, J., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Campo, E., Lynch, J.C., Connors, J.M., Vose, J.M., Armitage, J.O., Grogan, T.M., Staudt, L.M., Chan, W.C., 2004. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. Am. J. Pathol. 165, 159–166

Issels, R.D., Lindner, L.H., Verweij, J., Wust, P., Reichardt, P., Schem, B.-C., Abdel-Rahman, S., Daugaard, S., Salat, C., Wendtner, C.-M., Vujaskovic, Z., Wessalowski, R., Jauch, K.-W., Dürr, H.R., Ploner, F., Baur-Melnyk, A., Mansmann, U., Hiddemann, W., Blay, J.-Y., Hohenberger, P., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC-STBSG), European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO), 2010. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. Lancet Oncol. 11, 561–570. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70071-1

Jahresbericht 2019 - Deutsches Kinderkrebsregister - [WWW Document], URL https://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/42507/0/1c5976c2ab8af5b6b388149df7182582a4cd6a39/Buch_DKKR_Jahresbericht_2019_komplett.pdf (accessed 28.01.21)

Jang, T., Kim, S.H., Jeong, J.-H., Kim, S., Kim, Y.-G., Park, H.H., 2015. Crystal structure of caspase recruiting domain (CARD) of apoptosis repressor with CARD (ARC) and its implication in inhibition of apoptosis. Sci. Rep. 5. https://doi.org/10.1038/srep09847

Ji, F., Zhang, H., Wang, Y., Li, M., Xu, W., Kang, Y., Wang, Zhiwei, Wang, Zimin, Cheng, P., Tong, D., Li, C., Tang, H., 2013. MicroRNA-133a, downregulated in osteosarcoma, suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting Bcl-xL and Mcl-1. Bone 56, 220–226. https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.05.020

Jo, D.-G., Jun, J.-I., Chang, J.-W., Hong, Y.-M., Song, S., Cho, D.-H., Shim, S.M., Lee, H.-J., Cho, C., Kim, D.H., Jung, Y.-K., 2004. Calcium Binding of ARC Mediates Regulation of Caspase 8 and Cell Death. Mol. Cell. Biol. 24, 9763–9770. https://doi.org/10.1128/MCB.24.22.9763-9770.2004

Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A., Kaufmann, T., 2009. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. Nature 460, 1035–1039. https://doi.org/10.1038/nature08229

Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandenabeele,

P., Samson, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., 2012. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. Cell Death Differ. 19, 2003–2014. https://doi.org/10.1038/cdd.2012.90

Kågedal, K., Johansson, A.-C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N.S., Jürgensmeier, J.M., Öllinger, K., 2005. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis - involvement of Bax? Int. J. Exp. Pathol. 86, 309–321. https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2005.00442.x

Kang, Z., Chen, J.-J., Yu, Y., Li, B., Sun, S.-Y., Zhang, B., Cao, L., 2011. Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent anti-tumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 17, 3181–3192. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2874

Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., Youle, R.J., 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. Nature 443, 658–662. https://doi.org/10.1038/nature05111

Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G., 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res. 53, 3976–3985.

Kehr, S., Haydn, T., Bierbrauer, A., Irmer, B., Vogler, M., Fulda, S., 2020. Targeting BCL-2 proteins in pediatric cancer: Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 leads to rapid induction of intrinsic apoptosis. Cancer Lett. 482, 19–32. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.041

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26, 239–257.

Kerr, J.F.R., 1971. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. J. Pathol. 105, 13–20. https://doi.org/10.1002/path.1711050103

Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., Cheng, E.H.-Y., 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat. Cell Biol. 8, 1348–1358. https://doi.org/10.1038/ncb1499

Kim, H.-E., Du, F., Fang, M., Wang, X., 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 17545–17550. https://doi.org/10.1073/pnas.0507900102

Kipps, T.J., Eradat, H., Grosicki, S., Catalano, J., Cosolo, W., Dyagil, I.S., Yalamanchili, S., Chai, A., Sahasranaman, S., Punnoose, E., Hurst, D., Pylypenko, H., 2015. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk. Lymphoma 56, 2826–2833. https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1030638

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 14, 5579–5588

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

Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A., 2001. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8*. Journal of Biological Chemistry 276, 46639–46646. https://doi.org/10.1074/jbc.M105102200

Kivioja, J.L., Thanasopoulou, A., Kumar, A., Kontro, M., Yadav, B., Majumder, M.M., Javarappa, K.K., Eldfors, S., Schwaller, J., Porkka, K., Heckman, C.A., 2019. Dasatinib and navitoclax act synergistically to target NUP98-NSD1 + / FLT3 -ITD + acute myeloid leukemia. Leukemia 33, 1360–1372. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0327-2

Kliegman, R., Nelson, W.E. (Eds.), 2007. Nelson textbook of pediatrics, 18th ed. ed. Saunders, Philadelphia

Klingebiel, T., Boos, J., Beske, F., Hallmen, E., Int-Veen, C., Dantonello, T., Treuner, J., Gadner, H., Marky, I., Kazanowska, B., Koscielniak, E., 2008. Treatment of children with metastatic soft tissue sarcoma with oral maintenance compared to high dose chemotherapy: report of the HD CWS-96 trial. Pediatr. Blood Cancer 50, 739–745. https://doi.org/10.1002/pbc.21494

Klüttermann, K., Banning, U., Kachel, M., Krause, C., Körholz, D., Mauz-Körholz, C., 2006. TRAIL-induced cytotoxicity in a melphalan-resistant rhabdomyosarcoma cell line via activation of caspase-2. Anticancer Res. 26, 351–356.

Kondo, S., Shinomura, Y., Miyazaki, Y., Kiyohara, T., Tsutsui, S., Kitamura, S., Nagasawa, Y., Nakahara, M., Kanayama, S., Matsuzawa, Y., 2000. Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. Cancer Res. 60, 4328–4330

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., Schlesinger, P.H., 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ. 7, 1166–1173. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400783

Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Núñez, G., 1998. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 5156–5160

Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z.B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., Blasko, G., Robertson, A., Surgenor, A., Dokurno, P., Chen, I., Matassova, N., Smith, J., Pedder, C., Graham, C., Studeny, A., Lysiak-Auvity, G., Girard, A.-M., Gravé, F., Segal, D., Riffkin, C.D., Pomilio, G., Galbraith, L.C.A., Aubrey, B.J., Brennan, M.S., Herold, M.J., Chang, C., Guasconi, G., Cauquil, N., Melchiore, F., Guigal-Stephan, N., Lockhart, B., Colland, F., Hickman, J.A., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., Wei, A.H., Strasser, A., Lessene, G., Geneste, O., 2016. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. Nature 538, 477–482. https://doi.org/10.1038/nature19830

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C., 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. Cancer Res. 53, 4701–4714

Kung, G., Dai, P., Deng, L., Kitsis, R.N., 2014. A novel role for the apoptosis inhibitor ARC in suppressing TNFα-induced regulated necrosis. Cell Death Differ. 21, 634–644. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.195

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 2005. BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. Mol. Cell 17, 525–535. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.003

Kyhse-Andersen, J., 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods 10, 203–209

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lang, P., Pfeiffer, M., Müller, I., Schumm, M., Ebinger, M., Koscielniak, E., Feuchtinger, T., Föll, J., Martin, D., Handgretinger, R., 2006. Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. Klin. Pädiatr. 218, 321–326. https://doi.org/10.1055/s-2006-942256

Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H., 2005. Death receptor signaling. J. Cell Sci. 118, 265–267. https://doi.org/10.1242/jcs.01610

Lavrik, I.N., Mock, T., Golks, A., Hoffmann, J.C., Baumann, S., Krammer, P.H., 2008. CD95 Stimulation Results in the Formation of a Novel Death Effector Domain Protein-containing Complex. J. Biol. Chem. 283, 26401–26408. https://doi.org/10.1074/jbc.M800823200

Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C., 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 371, 346–347. https://doi.org/10.1038/371346a0

Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Kim, C.J., Cho, Y.G., Lee, J.H., Kim, H.S., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., Lee, S.H., 2004. Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. Carcinogenesis 25, 1371–1376. https://doi.org/10.1093/carcin/bgh145

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J., 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. Cancer Cell 2, 183–192

Leuschner, I., Newton, W.A., Schmidt, D., Sachs, N., Asmar, L., Hamoudi, A., Harms, D., Maurer, H.M., 1993. Spindle cell variants of embryonal rhabdomyosarcoma in the paratesticular region. A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. Am. J. Surg. Pathol. 17, 221–230

Leverson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., Kovar, P., Tanaka, A., Bruncko, M., Sheppard, G.S., Wang, L., Gierke, S., Kategaya, L., Anderson, D.J., Wong, C., Eastham-Anderson, J., Ludlam, M.J.C., Sampath, D., Fairbrother, W.J., Wertz, I., Rosenberg, S.H., Tse, C., Elmore, S.W., Souers, A.J., 2015. Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). Cell Death Dis. 6, e1590. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.561

Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. Cell 94, 491–501. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1

Li, J., Li, C., Zhang, D., Shi, D., Qi, M., Feng, J., Yuan, T., Xu, X., Liang, D., Xu, L., Zhang, H., Liu, Y., Chen, J., Ye, J., Jiang, W., Cui, Y., Zhang, Y., Peng, L., Zhou, Z., Chen, Y.-H., 2014. SNX13 reduction mediates heart failure through degradative sorting of apoptosis repressor with caspase recruitment domain. Nat. Commun. 5, 5177. https://doi.org/10.1038/ncomms6177

Li, J., Li, Y., Qin, D., von Harsdorf, R., Li, P., 2010. Mitochondrial fission leads to Smac/DIABLO release quenched by ARC. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death 15, 1187–1196. https://doi.org/10.1007/s10495-010-0514-8

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91, 479–489

Li, P.-F., Li, J., Müller, E.-C., Otto, A., Dietz, R., von Harsdorf, R., 2002. Phosphorylation by Protein Kinase CK2: A Signaling Switch for the Caspase-Inhibiting Protein ARC. Mol. Cell 10, 247–258. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00600-7

Li, X., Fan, R., Zou, X., Gao, L., Jin, H., Du, R., Xia, L., Fan, D., 2007. Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying immunocaspase-3 on hepatocellular carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 358, 489–494. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.134

Li, Y.-Z., Lu, D.-Y., Tan, W.-Q., Wang, J.-X., Li, P.-F., 2008. p53 Initiates Apoptosis by Transcriptionally Targeting the Antiapoptotic Protein ARC. Mol. Cell. Biol. 28, 564–574. https://doi.org/10.1128/MCB.00738-07

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell 89, 175–184

Lock, R., Carol, H., Houghton, P.J., Morton, C.L., Kolb, E.A., Gorlick, R., Reynolds, C.P., Maris, J.M., Keir, S.T., Wu, J., Smith, M.A., 2008. Initial testing (stage 1) of the BH3 mimetic ABT-263 by the pediatric preclinical testing program. Pediatr. Blood Cancer 50, 1181–1189. https://doi.org/10.1002/pbc.21433

Lopes, R.B., Gangeswaran, R., McNeish, I.A., Wang, Y., Lemoine, N.R., 2007. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. Int. J. Cancer 120, 2344–2352. https://doi.org/10.1002/ijc.22554

LoRusso, P., Hong, D., Heath, E., Kurzrock, R., Wang, D., Hsu, M., Goyal, L., Wiezorek, J., Storgard, C., Herbst, R., 2007. First-in-human study of AMG 655, a pro-apoptotic TRAIL receptor-2 agonist, in adult patients with advanced solid tumors. ASCO Meet. Abstr. 25, 3534.

Lu, D., Liu, J., Jiao, J., Long, B., Li, Q., Tan, W., Li, P., 2013. Transcription factor Foxo3a prevents apoptosis by regulating calcium through the apoptosis repressor with caspase recruitment domain. J. Biol. Chem. 288, 8491–8504. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442061

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. Cell 94, 481–490. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81589-5

Makin, G., Dive, C., 2001. Apoptosis and cancer chemotherapy. Trends Cell Biol. 11, S22-26. https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02124-9

Malempati, S., Weigel, B.J., Chi, Y.-Y., Tian, J., Anderson, J.R., Parham, D.M., Teot, L.A., Rodeberg, D.A., Yock, T.I., Shulkin, B.L., Spunt, S.L., Meyer, W.H., Hawkins, D.S., 2019. The addition of cixutumumab or temozolomide to intensive multiagent chemotherapy is feasible but does not improve outcome for patients with metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. Cancer 125, 290–297. https://doi.org/10.1002/cncr.31770

Mannhold, R., Fulda, S., Carosati, E., 2010. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. Drug Discov. Today 15, 210–219. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.01.003

Manon, S., Chaudhuri, B., Guérin, M., 1997. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. FEBS Lett. 415, 29–32

Mascarenhas, L., Chi, Y.-Y., Hingorani, P., Anderson, J.R., Lyden, E.R., Rodeberg, D.A., Indelicato, D.J., Kao, S.C., Dasgupta, R., Spunt, S.L., Meyer, W.H., Hawkins, D.S., 2019. Randomized Phase II Trial of Bevacizumab or Temsirolimus in Combination With Chemotherapy for First Relapse Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 37, 2866–2874. https://doi.org/10.1200/JCO.19.00576

Mascarenhas, L., Lyden, E.R., Breitfeld, P.P., Walterhouse, D.O., Donaldson, S.S., Paidas, C.N., Parham, D.M., Anderson, J.R., Meyer, W.H., Hawkins, D.S., 2010. Randomized Phase II Window Trial of Two Schedules of Irinotecan With Vincristine in Patients With First Relapse or Progression of Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. J. Clin. Oncol. 28, 4658–4663. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.7390

McAllister, R.M., Isaacs, H., Rongey, R., Peer, M., Au, W., Soukup, S.W., Gardner, M.B., 1977. Establishment of a human medulloblastoma cell line. Int. J. Cancer 20, 206–212. https://doi.org/10.1002/ijc.2910200207

McAllister, R.M., Melnyk, J., Finklestein, J.Z., Adams, E.C., Gardner, M.B., 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. Cancer 24, 520–526. https://doi.org/10.1002/1097-0142(196909)24:3<520::AID-CNCR2820240313>3.0.CO;2-M

McKimpson, W.M., Weinberger, J., Czerski, L., Zheng, M., Crow, M.T., Pessin, J.E., Chua, S.C., Kitsis, R.N., 2013. The apoptosis inhibitor ARC alleviates the ER stress response to promote β-cell survival. Diabetes 62, 183–193. https://doi.org/10.2337/db12-0504

Medina-Ramirez, C.M., Goswami, S., Smirnova, T., Bamira, D., Benson, B., Ferrick, N., Segall, J., Pollard, J.W., Kitsis, R.N., 2011. Apoptosis Inhibitor ARC Promotes Breast Tumorigenesis, Metastasis, and Chemoresistance. Cancer Res. 71, 7705–7715. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2192

Merchant, M.S., Geller, J.I., Baird, K., Chou, A.J., Galli, S., Charles, A., Amaoko, M., Rhee, E.H., Price, A., Wexler, L.H., Meyers, P.A., Widemann, B.C., Tsokos, M., Mackall, C.L., 2012. Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Lexatumumab in Pediatric Patients With Solid Tumors. J. Clin. Oncol. 30, 4141–4147. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.1055

Mercier, I., Vuolo, M., Jasmin, J.-F., Medina, C.M., Williams, M., Mariadason, J.M., Qian, H., Xue, X., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., Kitsis, R.N., 2008. ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) is a novel marker of human colon cancer. Cell Cycle 7, 1640–1647. https://doi.org/10.4161/cc.7.11.5979

Mercier, I., Vuolo, M., Madan, R., Xue, X., Levalley, A.J., Ashton, A.W., Jasmin, J.-F., Czaja, M.T., Lin, E.Y., Armstrong, R.C., Pollard, J.W., Kitsis, R.N., 2005. ARC, an apoptosis suppressor limited to terminally differentiated cells, is induced in human breast cancer and confers chemo- and radiation-resistance. Cell Death Differ. 12, 682–686. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401631

Merino, D., Kelly, G.L., Lessene, G., Wei, A.H., Roberts, A.W., Strasser, A., 2018. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. Cancer Cell 34, 879–891. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.004

Mérino, D., Khaw, S.L., Glaser, S.P., Anderson, D.J., Belmont, L.D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Campbell, K.J., Vandenberg, C.J., Cory, S., Roberts, A.W., Ludlam, M.J.C., Huang, D.C.S., Bouillet, P., 2012. Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. Blood 119, 5807–5816. https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-400929

Mesri, M., Wall, N.R., Li, J., Kim, R.W., Altieri, D.C., 2001. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. J. Clin. Invest. 108, 981–990. https://doi.org/10.1172/JCI12983

Meza, J.L., Anderson, J., Pappo, A.S., Meyer, W.H., Children's Oncology Group, 2006. Analysis of prognostic factors in patients with nonmetastatic rhabdomyosarcoma treated on intergroup rhabdomyosarcoma studies III and IV: the Children's Oncology Group. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 24, 3844–3851. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.3801

Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., Kroemer, G., 2006. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. Trends Cell Biol. 16, 264–272. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.03.008

Montero, J., Letai, A., 2018. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? Cell Death Differ. 25, 56–64. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.183

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63

Nair, P.M., Flores, H., Gogineni, A., Marsters, S., Lawrence, D.A., Kelley, R.F., Ngu, H., Sagolla, M., Komuves, L., Bourgon, R., Settleman, J., Ashkenazi, A., 2015. Enhancing the antitumor efficacy of a cell-surface death ligand by covalent membrane display. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 5679–5684. https://doi.org/10.1073/pnas.1418962112

Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. Mol. Cell 7, 683–694. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00214-3

Nam, Y.-J., Mani, K., Ashton, A.W., Peng, C.-F., Krishnamurthy, B., Hayakawa, Y., Lee, P., Korsmeyer, S.J., Kitsis, R.N., 2004. Inhibition of Both the Extrinsic and Intrinsic Death Pathways through Nonhomotypic Death-Fold Interactions. Mol. Cell 15, 901–912. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.020

Nam, Y.-J., Mani, K., Wu, L., Peng, C.-F., Calvert, J.W., Foo, R.S.-Y., Krishnamurthy, B., Miao, W., Ashton, A.W., Lefer, D.J., Kitsis, R.N., 2007. The Apoptosis Inhibitor ARC Undergoes

Ubiquitin-Proteasomal-mediated Degradation in Response to Death Stimuli IDENTIFICATION OF A DEGRADATION-RESISTANT MUTANT. J. Biol. Chem. 282, 5522–5528. https://doi.org/10.1074/jbc.M609186200

Nascimento, A.F., Fletcher, C.D.M., 2005. Spindle cell rhabdomyosarcoma in adults. Am. J. Surg. Pathol. 29, 1106–1113

Ni Chonghaile, T., Sarosiek, K.A., Vo, T.-T., Ryan, J.A., Tammareddi, A., Moore, V.D.G., Deng, J., Anderson, K.C., Richardson, P., Tai, Y.-T., Mitsiades, C.S., Matulonis, U.A., Drapkin, R., Stone, R., Deangelo, D.J., McConkey, D.J., Sallan, S.E., Silverman, L., Hirsch, M.S., Carrasco, D.R., Letai, A., 2011. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. Science 334, 1129–1133. https://doi.org/10.1126/science.1206727

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, † Nobuyuki, 2000. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. Science 288, 1053–1058. https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053

Olberding, K.E., Wang, X., Zhu, Y., Pan, J., Rai, S.N., Li, C., 2010. Actinomycin D synergistically enhances the efficacy of the BH3 mimetic ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression. Cancer Biol. Ther. 10, 918–929. https://doi.org/10.4161/cbt.10.9.13274

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettesheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., O'Connor, J.M., Oleksijew, A., Petros, A.M., Reed, J.C., Shen, W., Tahir, S.K., Thompson, C.B., Tomaselli, K.J., Wang, B., Wendt, M.D., Zhang, H., Fesik, S.W., Rosenberg, S.H., 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. Nature 435, 677–681. https://doi.org/10.1038/nature03579

Ouyang, X., Shi, M., Jie, F., Bai, Y., Shen, P., Yu, Z., Wang, X., Huang, C., Tao, M., Wang, Z., Xie, C., Wu, Q., Shu, Y., Han, B., Zhang, F., Zhang, Y., Hu, C., Ma, X., Liang, Y., Wang, A., Lu, B., Shi, Y., Chen, J., Zhuang, Z., Wang, J., Huang, J., Wang, C., Bai, C., Zhou, X., Li, Q., Chen, F., Yu, H., Feng, J., 2018. Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Invest. New Drugs 36, 315–322. https://doi.org/10.1007/s10637-017-0536-y

Pacher, P., Csordás, G., Hajnóczky, G., 2001. Mitochondrial ca(2+) signaling and cardiac apoptosis. Biol. Signals Recept. 10, 200–223. https://doi.org/46888

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M., 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 276, 111–113.

Pang, X., Zhang, J., Lopez, H., Wang, Y., Li, W., O'Neill, K.L., Evans, J.J.D., George, N.M., Long, J., Chen, Y., Luo, X., 2014. The Carboxyl-terminal Tail of Noxa Protein Regulates the Stability of Noxa and Mcl-1. J. Biol. Chem. 289, 17802–17811. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548172

Pazzaglia, L., Chiechi, A., Conti, A., Gamberi, G., Magagnoli, G., Novello, C., Morandi, L., Picci, P., Mercuri, M., Benassi, M.S., 2009. Genetic and molecular alterations in rhabdomyosarcoma: mRNA overexpression of MCL1 and MAP2K4 genes. Histol. Histopathol. 24, 61–67. https://doi.org/10.14670/HH-24.61

Pecorino, L., 2012. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics, Third edition. ed. Oxford University Press, Oxford.

Pérez-Martínez, A., de Prada Vicente, I., Fernández, L., González-Vicent, M., Valentín, J., Martín, R., Maxwell, H., Sevilla, J., Vicario, J.L., Díaz, M.Á., 2012. Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. Exp. Hematol. 40, 882-891.e1. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.07.004

Petak, I., Douglas, L., Tillman, D.M., Vernes, R., Houghton, J.A., 2000. Pediatric Rhabdomyosarcoma Cell Lines Are Resistant to Fas-induced Apoptosis and Highly Sensitive to TRAIL-induced Apoptosis. Clin. Cancer Res. 6, 4119–4127.

Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T., Fesik, S.W., 2001. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 3012–3017. https://doi.org/10.1073/pnas.041619798

Philchenkov, A., Zavelevich, M., Kroczak, T.J., Los, M., 2004. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. Exp. Oncol. 26, 82–97.

Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., Lindemann, D., 1999. Foamy Virus Capsids Require the Cognate Envelope Protein for Particle Export. J. Virol. 73, 2613–2621.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan,

K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D., Ashkenazi, A., 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. Nature 396, 699–703. https://doi.org/10.1038/25387

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A., 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J. Biol. Chem. 271, 12687–12690.

Preuss, E., Hugle, M., Reimann, R., Schlecht, M., Fulda, S., 2013. Pan-Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor AZD8055 Primes Rhabdomyosarcoma Cells for ABT-737-induced Apoptosis by Down-regulating Mcl-1 Protein. J. Biol. Chem. 288, 35287–35296. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495986

Pyo, J.-O., Nah, J., Kim, Hyo-Jin, Chang, J.-W., Song, Y.-W., Yang, D.-K., Jo, D.-G., Kim, H.-R., Chae, H.-J., Chae, S.-W., Hwang, S.-Y., Kim, S.-J., Kim, Hyo-Joon, Cho, C., Oh, C.-G., Park, W.J., Jung, Y.-K., 2008. Protection of cardiomyocytes from ischemic/hypoxic cell death via Drbp1 and pMe2GlyDH in cardio-specific ARC transgenic mice. J. Biol. Chem. 283, 30707–30714. https://doi.org/10.1074/jbc.M804209200

Qin, H., Srinivasula, S.M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., Shi, Y., 1999. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. Nature 399, 549–557. https://doi.org/10.1038/21124

Quadrilatero, J., Bloemberg, D., 2010. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is dramatically reduced in cardiac, skeletal, and vascular smooth muscle during hypertension. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 1437–1442. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.084

Quadrilatero, J., Rush, J.W.E., 2008. Evidence for a pro-apoptotic phenotype in skeletal muscle of hypertensive rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 368, 168–174. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.067

Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., Perucho, M., 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science 275, 967–969.

Razorenova, O.V., Castellini, L., Colavitti, R., Edgington, L.E., Nicolau, M., Huang, X., Bedogni, B., Mills, E.M., Bogyo, M., Giaccia, A.J., 2014. The Apoptosis Repressor with a CARD Domain (ARC) Gene Is a Direct Hypoxia-Inducible Factor 1 Target Gene and Promotes Survival and Proliferation of VHL-Deficient Renal Cancer Cells. Mol. Cell. Biol. 34, 739–751. https://doi.org/10.1128/MCB.00644-12

Ren, J., Babcock, S.A., Li, Q., Huff, A.F., Li, S.-Y., Doser, T.A., 2009. Aldehyde dehydrogenase-2 transgene ameliorates chronic alcohol ingestion-induced apoptosis in cerebral cortex. Toxicol. Lett. 187, 149–156. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.02.019

Renault, T.T., Elkholi, R., Bharti, A., Chipuk, J.E., 2014. B cell lymphoma-2 (BCL-2) homology domain 3 (BH3) mimetics demonstrate differential activities dependent upon the functional repertoire of pro- and anti-apoptotic BCL-2 family proteins. J. Biol. Chem. 289, 26481–26491. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.569632

Riede, U.-N., Bianchi, L. (Eds.), 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen, 5., komplett überarb. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart.

Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 897–907. https://doi.org/10.1038/nrm1496

Roberts, A.W., Seymour, J.F., Brown, J.R., Wierda, W.G., Kipps, T.J., Khaw, S.L., Carney, D.A., He, S.Z., Huang, D.C.S., Xiong, H., Cui, Y., Busman, T.A., McKeegan, E.M., Krivoshik, A.P., Enschede, S.H., Humerickhouse, R., 2012. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 30, 488–496. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.7898

Rohn, J.L., Noteborn, M.H.M., 2004. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death 9, 315–322.

Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., Verheij, M., Borst, J., 2012. Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. Cell Death Dis. 3, e366. https://doi.org/10.1038/cddis.2012.109

Rubin, B.P., Nishijo, K., Chen, H.-I.H., Yi, X., Schuetze, D.P., Pal, R., Prajapati, S.I., Abraham, J., Arenkiel, B.R., Chen, Q.-R., Davis, S., McCleish, A.T., Capecchi, M.R., Michalek, J.E., Zarzabal, L.A., Khan, J., Yu, Z., Parham, D.M., Barr, F.G., Meltzer, P.S., Chen, Y., Keller, C., 2011. Evidence for an Unanticipated Relationship between Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma and Embryonal Rhabdomyosarcoma. Cancer Cell 19, 177–191. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.023

Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Oliveira, M.R. de, Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., Ranson, M.R., Dive, C., McKeegan, E.M.,

Chyla, B.J., Dowell, B.L., Chakravartty, A., Nolan, C.E., Rudersdorf, N., Busman, T.A., Mabry, M.H., Krivoshik, A.P., Humerickhouse, R.A., Shapiro, G.I., Gandhi, L., 2012. Phase II Study of Single-Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer. Clin. Cancer Res. 18, 3163–3169. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3090

Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1999. Caspase activation: The induced-proximity model. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 10964–10967. https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.10964

Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., Letai, A., 2013. BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. Mol. Cell 51, 751–765. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.048

Sarosiek, K.A., Letai, A., 2016. Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise. FEBS J. 283, 3523–3533. https://doi.org/10.1111/febs.13714

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B., Fesik, S.W., 1997. Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. Science 275, 983–986. https://doi.org/10.1126/science.275.5302.983

Schaefer, U., Voloshanenko, O., Willen, D., Walczak, H., 2007. TRAIL: a multifunctional cytokine. Front. Biosci. J. Virtual Libr. 12, 3813–3824.

Schlag, P.M. (Ed.), 2011. Weichgewebetumoren: interdisziplinäres Vorgehen ; mit 55 Tabellen, 1. Auflage. ed. Springer Medizin, Heidelberg ;New York.

Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., Tschopp, J., 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. Immunity 7, 831–836.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E., 1998. Apoptosis signaling by death receptors. Eur. J. Biochem. FEBS 254, 439–459.

Sheikh, M.S., Huang, Y., Fernandez-Salas, E.A., El-Deiry, W.S., Friess, H., Amundson, S., Yin, J., Meltzer, S.J., Holbrook, N.J., Fornace, A.J., 1999. The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. Oncogene 18, 4153–4159. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202763

Skapek, S.X., Anderson, J., Barr, F.G., Bridge, J.A., Gastier-Foster, J.M., Parham, D.M., Rudzinski, E.R., Triche, T., Hawkins, D.S., 2013. PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: a children's oncology group report. Pediatr. Blood Cancer 60, 1411–1417. https://doi.org/10.1002/pbc.24532

Smith, M.A., Morton, C.L., Kolb, E.A., Gorlick, R., Keir, S.T., Carol, H., Lock, R., Kang, M.H., Reynolds, C.P., Maris, J.M., Watkins, A.E., Houghton, P.J., 2010. Initial testing (stage 1) of mapatumumab (HGS-ETR1) by the pediatric preclinical testing program. Pediatr. Blood Cancer 54, 307–310. https://doi.org/10.1002/pbc.22188

Smith, M.L., Chyla, B., McKeegan, E., Tahir, S.K., 2017. Development of a flow cytometric method for quantification of BCL-2 family members in chronic lymphocytic leukemia and correlation with sensitivity to BCL-2 family inhibitors. Cytometry B Clin. Cytom. 92, 331–339. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21383

Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., International Union against Cancer (Eds.), 2010. TNM classification of malignant tumours, 7th ed. ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ.

Soria, J.-C., Márk, Z., Zatloukal, P., Szima, B., Albert, I., Juhász, E., Pujol, J.-L., Kozielski, J., Baker, N., Smethurst, D., Hei, Y., Ashkenazi, A., Stern, H., Amler, L., Pan, Y., Blackhall, F., 2011. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 29, 4442–4451. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.2623

Soria, J.-C., Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X., Hsu, C.-P., Reese, D., Wiezorek, J., Blackhall, F., 2010. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 28, 1527–1533. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.4847

Souers, A.J., Leverson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., Huang, D.C.S., Hymowitz, S.G., Jin, S., Khaw, S.L., Kovar, P.J., Lam, L.T., Lee, J., Maecker, H.L., Marsh, K.C., Mason, K.D., Mitten, M.J., Nimmer, P.M., Oleksijew, A., Park, C.H., Park, C.-M., Phillips, D.C., Roberts, A.W., Sampath, D., Seymour, J.F., Smith, M.L., Sullivan, G.M., Tahir, S.K., Tse, C., Wendt, M.D., Xiao, Y., Xue, J.C., Zhang, H., Humerickhouse, R.A., Rosenberg, S.H., Elmore, S.W.,

2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat. Med. 19, 202–208. https://doi.org/10.1038/nm.3048
Stephen, A.G., Esposito, D., Bagni, R.K., McCormick, F., 2014. Dragging Ras Back in the Ring. Cancer Cell 25, 272–281. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017
Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., Cory, S., 1990. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. Nature 348, 331–333. https://doi.org/10.1038/348331a0
Stratton, M.R., Darling, J., Pilkington, G.J., Lantos, P.L., Reeves, B.R., Cooper, C.S., 1989. Characterization of the human cell line TE671. Carcinogenesis 10, 899–905.
Sun, S., Li, Z., Sun, L., Yang, C., Mei, Z., Ouyang, W., Yang, B., Xie, C., 2014. Results on efficacy and safety of cancer treatment with or without tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-related agents: A meta-analysis. Mol. Clin. Oncol. 2, 440–448. https://doi.org/10.3892/mco.2014.261
Sun, X., Guo, W., Shen, J.K., Mankin, H.J., Hornicek, F.J., Duan, Z., Sun, X., Guo, W., Shen, J.K., Mankin, H.J., Hornicek, F.J., Duan, Z., 2015. Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology, Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. Sarcoma Sarcoma 2015, 2015, e232010. https://doi.org/10.1155/2015/232010, 10.1155/2015/232010
Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397, 441–446. https://doi.org/10.1038/17135
Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Takahashi, R., 2001. 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. 98, 8662–8667. https://doi.org/10.1073/pnas.161506698
Tahir, S.K., Yang, X., Anderson, M.G., Morgan-Lappe, S.E., Sarthy, A.V., Chen, J., Warner, R.B., Ng, S.-C., Fesik, S.W., Elmore, S.W., Rosenberg, S.H., Tse, C., 2007. Influence of Bcl-2 Family Members on the Cellular Response of Small-Cell Lung Cancer Cell Lines to ABT-737. Cancer Res. 67, 1176–1183. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2203
Tait, S.W.G., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 621–632. https://doi.org/10.1038/nrm2952
Tan, C., Dlugosz, P.J., Peng, J., Zhang, Z., Lapolla, S.M., Plafker, S.M., Andrews, D.W., Lin, J., 2006. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. J. Biol. Chem. 281, 14764–14775. https://doi.org/10.1074/jbc.M602374200
Tan, W.-Q., Wang, J.-X., Lin, Z.-Q., Li, Y.-R., Lin, Y., Li, P.-F., 2008. Novel Cardiac Apoptotic Pathway The Dephosphorylation of Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain by Calcineurin. Circulation 118, 2268–2276. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.750869
Tolcher, A.W., Mita, M., Meropol, N.J., von Mehren, M., Patnaik, A., Padavic, K., Hill, M., Mays, T., McCoy, T., Fox, N.L., Halpern, W., Corey, A., Cohen, R.B., 2007. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 25, 1390–1395. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.8898
Toth, C., Funke, S., Nitsche, V., Liverts, A., Zlachevska, V., Gasis, M., Wiek, C., Hanenberg, H., Mahotka, C., Schirmacher, P., Heikaus, S., 2017. The role of apoptosis repressor with a CARD domain (ARC) in the therapeutic resistance of renal cell carcinoma (RCC): the crucial role of ARC in the inhibition of extrinsic and intrinsic apoptotic signalling. Cell Commun. Signal. CCS 15. https://doi.org/10.1186/s12964-017-0170-5
Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 4350–4354.
Trarbach, T., Moehler, M., Heinemann, V., Köhne, C.-H., Przyborek, M., Schulz, C., Sneller, V., Gallant, G., Kanzler, S., 2010. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. Br. J. Cancer 102, 506–512. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605507
Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S.K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S.H., Elmore, S.W., 2008. ABT-263: A Potent and Orally

Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. Cancer Res. 68, 3421–3428. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5836
Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M., 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 228, 1440–1443.
Ueno, T., Uehara, S., Nakahata, K., Okuyama, H., 2016. Survivin selective inhibitor YM155 promotes cisplatin-induced apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma. Int. J. Oncol. 48, 1847–1854. https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3438
van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., Adams, J.M., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. Cancer Cell 10, 389–399. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.027
van Erp, A.E.M., Versleijen-Jonkers, Y.M.H., van der Graaf, W.T.A., Fleuren, E.D.G., 2018. Targeted Therapy-based Combination Treatment in Rhabdomyosarcoma. Mol. Cancer Ther. 17, 1365–1380. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1131
Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L., 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell 102, 43–53.
Wagner, L.M., McAllister, N., Goldsby, R.E., Rausen, A.R., McNall-Knapp, R.Y., McCarville, M.B., Albritton, K., 2007. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma. Pediatr. Blood Cancer 48, 132–139. https://doi.org/10.1002/pbc.20697
Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J. 16, 5386–5397. https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5386
Wang, B., Ni, Z., Dai, X., Qin, L., Li, X., Xu, L., Lian, J., He, F., 2014. The Bcl-2/xL inhibitor ABT-263 increases the stability of Mcl-1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells. Mol. Cancer 13, 98. https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-98
Wang, J., Feng, C., He, Y., Ding, W., Sheng, J., Arshad, M., Zhang, X., Li, P., 2015. Phosphorylation of apoptosis repressor with caspase recruitment domain by protein kinase CK2 contributes to chemotherapy resistance by inhibiting doxorubicin induced apoptosis. Oncotarget 6, 27700–27713.
Wang, J.-X., Li, Q., Li, P.-F., 2009. Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain Contributes to Chemotherapy Resistance by Abolishing Mitochondrial Fission Mediated by Dynamin-Related Protein-1. Cancer Res. 69, 492–500. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2962
Wang, J.-X., Zhang, X.-J., Feng, C., Sun, T., Wang, K., Wang, Y., Zhou, L.-Y., Li, P.-F., 2015. MicroRNA-532-3p regulates mitochondrial fission through targeting apoptosis repressor with caspase recruitment domain in doxorubicin cardiotoxicity. Cell Death Dis. 6, e1677. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.41
Wang, L., Du, F., Wang, X., 2008. TNF-α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. Cell 133, 693–703. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.036
Wang, M., Qanungo, S., Crow, M.T., Watanabe, M., Nieminen, A.-L., 2005. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) is expressed in cancer cells and localizes to nuclei. FEBS Lett. 579, 2411–2415. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.040
Wang, Q., Li, A., Wang, H., Wang, J., 2012. Knockdown of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) increases the sensitivity of human glioma cell line U251MG to VM-26. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 5, 555–561.
Wang, Y., Cao, R., Liu, D., Chervin, A., Yuan, J., An, J., Huang, Z., 2007. Oligomerization of BH4-truncated Bcl-xL in solution. Biochem. Biophys. Res. Commun. 361, 1006–1011. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.122
Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. Genes Dev. 14, 2060–2071. https://doi.org/10.1101/gad.14.16.2060
Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. Science 292, 727–730. https://doi.org/10.1126/science.1059108
Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Gores, G.J., 2002. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283, G947-956. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00151.2002
Wertz, I.E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D.J., Helgason, E., Ernst, J.A., Eby, M., Liu, J., Belmont, L.D., Kaminker, J.S., O'Rourke, K.M., Pujara, K., Kohli,

P.B., Johnson, A.R., Chiu, M.L., Lill, J.R., Jackson, P.K., Fairbrother, W.J., Seshagiri, S., Ludlam, M.J.C., Leong, K.G., Dueber, E.C., Maecker, H., Huang, D.C.S., Dixit, V.M., 2011. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. Nature 471, 110–114. https://doi.org/10.1038/nature09779

Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 3, 673–682.

William C. Earnshaw, Luis M. Martins, Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. Annu. Rev. Biochem. 68, 383–424. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.383

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. Genes Dev. 19, 1294–1305. https://doi.org/10.1101/gad.1304105

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., Delft, M.F. van, Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R.M., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2007. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. Science 315, 856–859. https://doi.org/10.1126/science.1133289

Wittekind, C., Union for International Cancer Control (Eds.), 2017. TNM - Klassifikation maligner Tumoren, Achte Auflage. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J., 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J. Cell Biol. 139, 1281–1292.

Wong, R.S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR 30, 87. https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87

Wu, L., Nam, Y.-J., Kung, G., Crow, M.T., Kitsis, R.N., 2010. Induction of the Apoptosis Inhibitor ARC by Ras in Human Cancers. J. Biol. Chem. 285, 19235–19245. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.114892

Wu, P., Tang, Y., He, J., Qi, L., Jiang, W., Zhao, S., 2013. ARC is highly expressed in nasopharyngeal carcinoma and confers X-radiation and cisplatin resistance. Oncol. Rep. 30, 1807–1813. https://doi.org/10.3892/or.2013.2622

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell Death: The Significance of Apoptosis, in: G.H. Bourne, J.F.D. and K.W.J. (Ed.), International Review of Cytology. Academic Press, pp. 251–306.

Xin, M., Li, R., Xie, M., Park, D., Owonikoko, T.K., Sica, G.L., Corsino, P.E., Zhou, J., Ding, C., White, M.A., Magis, A.T., Ramalingam, S.S., Curran, W.J., Khuri, F.R., Deng, X., 2014. Small-molecule Bax agonists for cancer therapy. Nat. Commun. 5, 4935. https://doi.org/10.1038/ncomms5935

Yang, I.-H., Jung, J.-Y., Kim, S.-H., Yoo, E.-S., Cho, N.-P., Lee, H., Lee, J.-Y., Hong, S.D., Shin, J.-A., Cho, S.-D., 2019. ABT-263 exhibits apoptosis-inducing potential in oral cancer cells by targeting C/EBP-homologous protein. Cell. Oncol. 42, 357–368. https://doi.org/10.1007/s13402-019-00431-5

Yecies, D., Carlson, N.E., Deng, J., Letai, A., 2010. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. Blood 115, 3304–3313. https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233304

Younes, A., Vose, J.M., Zelenetz, A.D., Smith, M.R., Burris, H.A., Ansell, S.M., Klein, J., Halpern, W., Miceli, R., Kumm, E., Fox, N.L., Czuczman, M.S., 2010. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. Br. J. Cancer 103, 1783–1787. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605987

Yuan, X.-M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., Brunk, U.T., 2002. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 6286–6291. https://doi.org/10.1073/pnas.092135599

Zaiman, A.L., Damico, R., Thoms-Chesley, A., Files, D.C., Kesari, P., Johnston, L., Swaim, M., Mozammel, S., Myers, A.C., Halushka, M., El-Haddad, H., Shimoda, L.A., Peng, C.-F., Hassoun, P.M., Champion, H.C., Kitsis, R.N., Crow, M.T., 2011. A Critical Role for the Protein Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. Circulation 124, 2533–2542. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034512

Zhang, X.-Y., La Russa, V.F., Reiser, J., 2004. Transduction of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Using Lentivirus Vectors Pseudotyped with Modified RD114 Envelope Glycoproteins. J. Virol. 78, 1219–1229. https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1219-1229.2004

Zhang, Y.-Q., Herman, B., 2008. Expression and modification of ARC (apoptosis repressor with a CARD domain) is distinctly regulated by oxidative stress in cancer cells. J. Cell. Biochem. 104, 818–825. https://doi.org/10.1002/jcb.21666

Zinkel, S.S., Hurov, K.E., Ong, C., Abtahi, F.M., Gross, A., Korsmeyer, S.J., 2005. A Role for Proapoptotic BID in the DNA-Damage Response. Cell 122, 579–591. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.022

Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., Thompson, C.B., 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. J. Cell Biol. 162, 59–69. https://doi.org/10.1083/jcb.200302084

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X., 1997. Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3. Cell 90, 405–413. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80501-2

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X., 1999. An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. J. Biol. Chem. 274, 11549–11556. https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549

6 Anhang

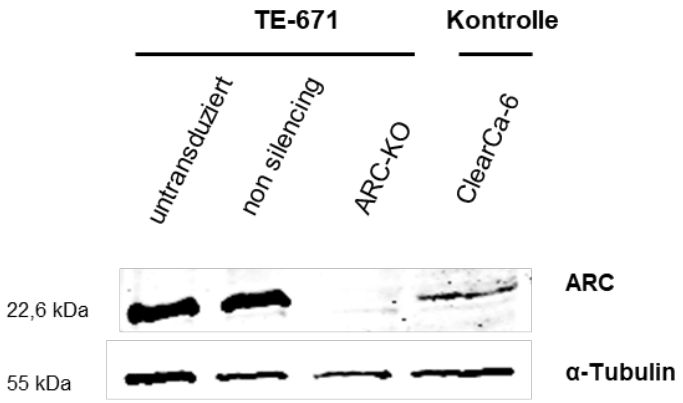


Abb. 19: Vergleich der ARC-Expression in der RMS-Zelllinie TE-671 und der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6 mittels Western Blot. Zur Bestätigung der gleichmäßigen Auftragungsmenge der Proteine wurde das *housekeeping*-Gen α-Tubulin detektiert. ARC-KO: ARC-*Knock-down;* kDa: Kilodalton.

	Zellgruppe			
	TE-671			ClearCa-6
	untransduziert	non-silencing	ARC-KO	untransduziert
Versuch 1	55,1	50,6	9,7	
Versuch 2	87,4	80	46,4	
Versuch 3	2,8	7,7	0,2	0,9

Tabelle 12: Densitometrische Auswertung der ARC-Expression im RMS und im Nierenzellkarzinom. Die gemessenen Extinktionssignale wurden densitometrisch erfasst und an α-Tubulin oder GAPDH genormt. ARC-KO: ARC-*Knock-down*.

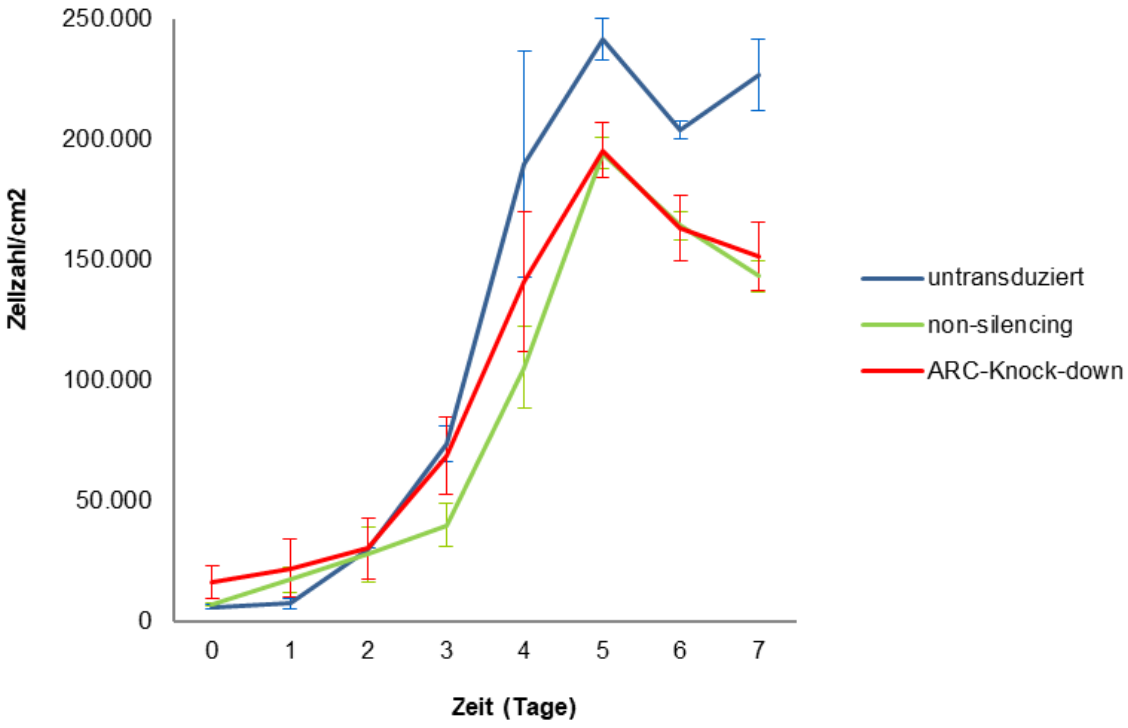


Abb. 20: Wachstumskurven aller verwendeten Varianten der Rhabdomyosarkomzelllinie TE-671. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen wurde die optische Dichte täglich mittels MTT-*Assay* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Messungen.

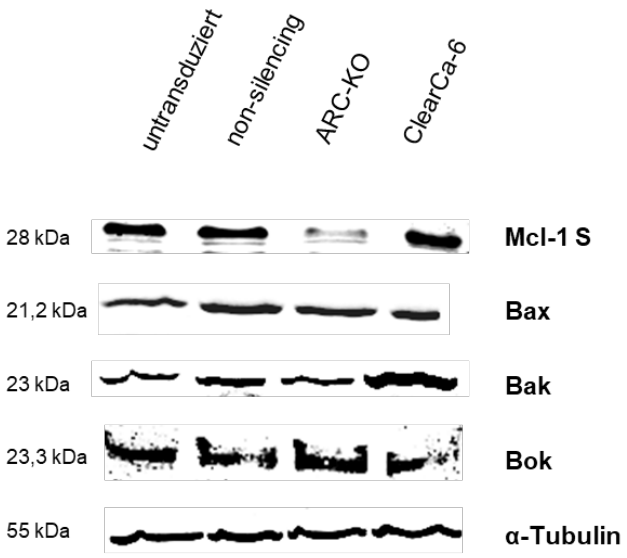


Abb. 21: Expression proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie in der RMS-Zelllinie TE-671 und in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6. Zur Bestätigung der gleichmäßigen Auftragungsmenge der Proteine wurde das *housekeeping*-Gen α-Tubulin detektiert. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; kDa: Kilodalton.

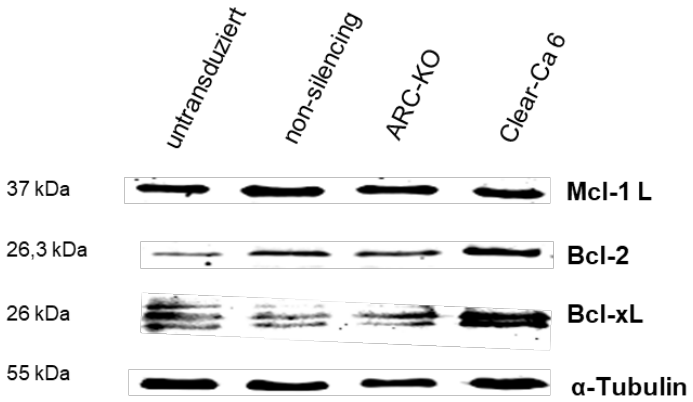
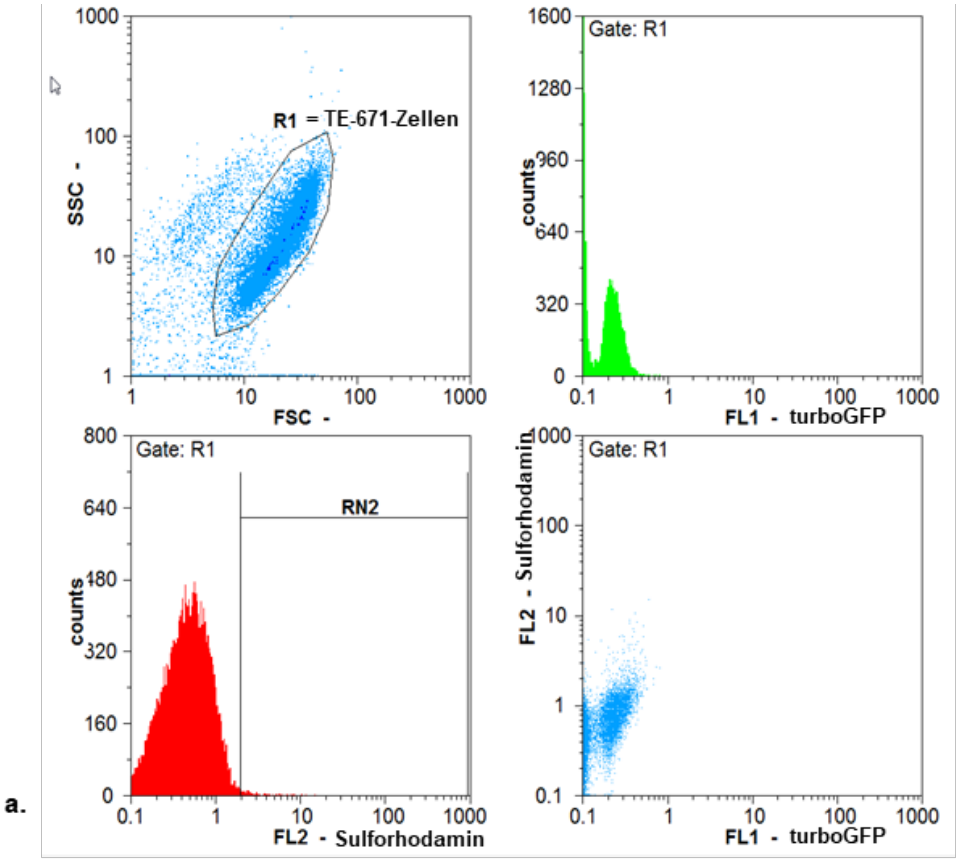


Abb. 22: Expression antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie in der RMS-Zelllinie TE-671 und in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6. Zur Bestätigung der gleichmäßigen Auftragungsmenge der Proteine wurde das *housekeeping*-Gen α-Tubulin detektiert. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; kDa: Kilodalton.



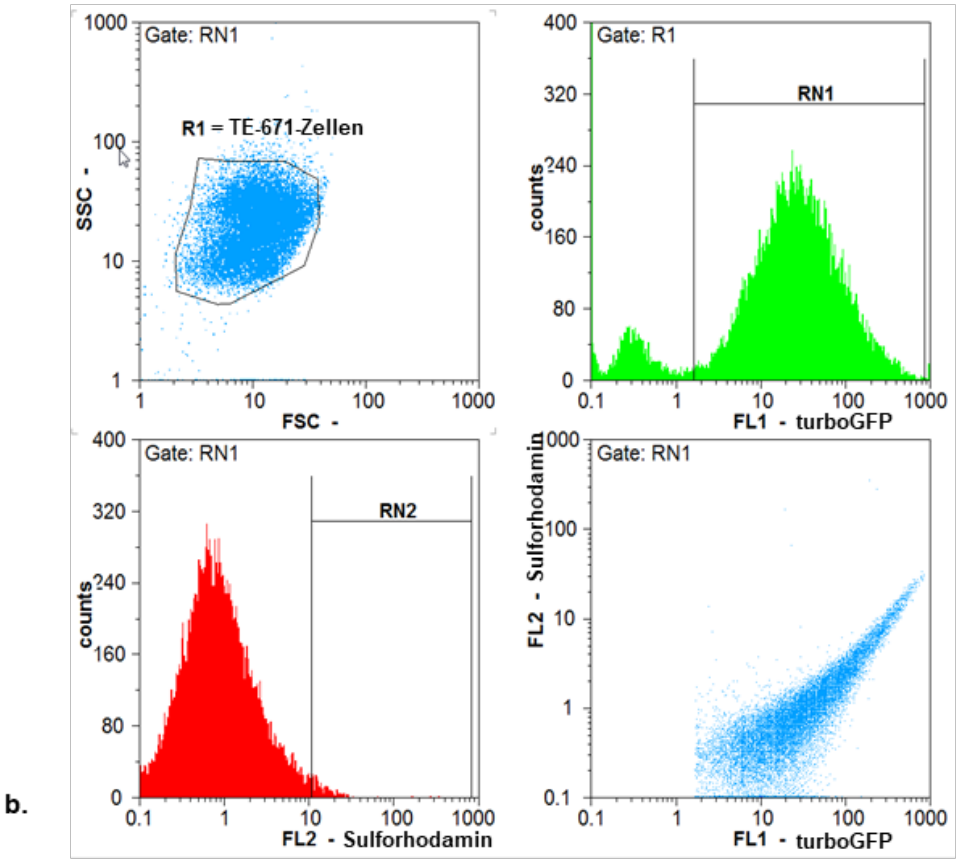


Abb. 23: Exemplarische Darstellung eines Dot-Plots zur Caspaseaktivitätsmessung mittels Durchflusszytometrie. Die Darstellung in Diagrammen erfolgte unter Zuhilfenahme der Software FloMax®. Das *Gate* RN1 wurde zur Selektion turboGFP-exprimierender Zellen verwendet. Die

Caspaseaktivierung wurde im *Gate* RN2 durch Analyse des Sulforhodaminsignals dargestellt. Das *Gate* R1 diente der Markierung der untersuchten Zellpopulation und der Vermeidung von Artefakten durch zellfremde Partikel. Vorwärtsstreulicht (FSC; *forward scatter*) lieferte eine Aussage über die Größe und Seitwärtsstreulicht (SSC; *side scatter*) über die Granularität der erfassten Zellpopulation. *Counts* = Zellzahl. **a.** Untransduzierte RMS-Zellpopulation. **b.** ARC-*Knock-down*-Zellpopulation.

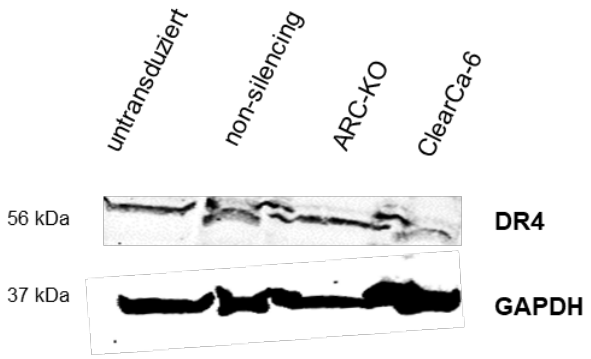
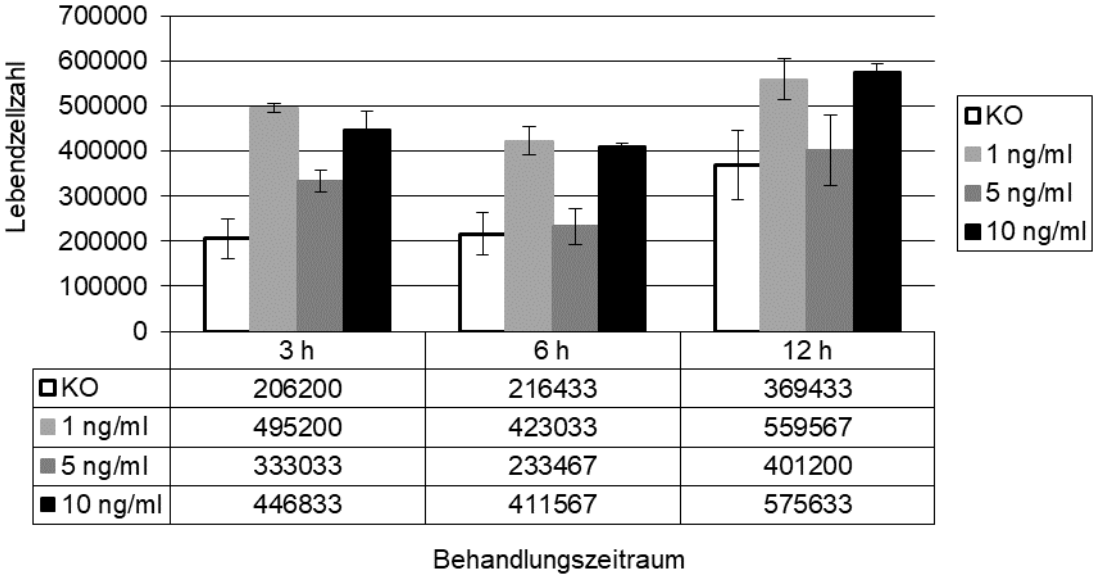
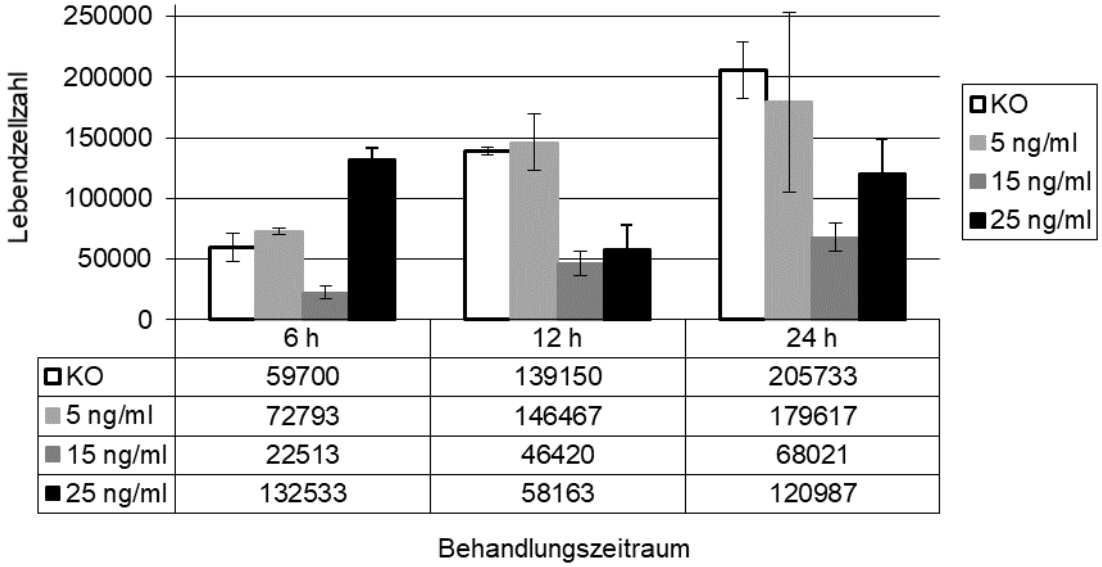


Abb. 24: Expression des DR4 Rezeptors im RMS und in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-6. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Auftragungsmenge diente GAPDH. ARC-KO: ARC-*Knock-down*; kDa: Kilodalton.



	3 h	6 h	12 h
KO	206200	216433	369433
1 ng/ml	495200	423033	559567
5 ng/ml	333033	233467	401200
10 ng/ml	446833	411567	575633

Abb. 25: Dosisfindungsversuche an untransduzierten TE-671-Zellen mit skTRAIL. Darstellung der absoluten Lebendzellzahl nach einer 3-, 6- und 12-stündigen Behandlung mit 1, 5 und 10 ng/ml skTRAIL. Mittelwerte von 3 Versuchswiederholungen. KO: unbehandelte Kontrolle.



	6 h	12 h	24 h
KO	59700	139150	205733
5 ng/ml	72793	146467	179617
15 ng/ml	22513	46420	68021
25 ng/ml	132533	58163	120987

Abb. 26: Dosisfindungsversuche an untransduzierten TE-671-Zellen mit skTRAIL. Darstellung der absoluten Lebendzellzahl nach einer 6-, 12- und 24-stündigen Behandlung mit 5, 15 und 25 ng/ml skTRAIL. Mittelwerte von 3 Versuchswiederholungen. KO: unbehandelte Kontrolle.