

## Zusammenfassung

Das maligne Melanom der Haut ist besonders charakterisiert durch seine ununterbrochen hohe Mortalität und eine gestiegene Inzidenz in den letzten Dekaden. Von großer Bedeutung ist neben dem hohen metastatischen Potenzial auch die Apoptoseresistenz. Diese führt sowohl zu einer verminderten Erkennung der Krebszellen durch das Immunsystem, als auch zur Ineffizienz von Chemotherapeutika. Neue therapeutische Strategien werden daher benötigt, um die schlechte Prognose des malignen Melanoms zu verbessern.

Bei der Apoptose handelt es sich um ein gut definiertes genetisches Todesprogramm, das zum geordneten Abbau von zellularen Komponenten führt, wobei die Membran-Integrität bis zuletzt erhalten bleibt. In den beiden bestbeschriebenen Apoptose-Signalwegen spielen Aspartat-spezifische Cystein Proteasen (Caspasen) als Effektor-Moleküle für die Signalvermittlung eine entscheidende Rolle. Der intrinsische Signalweg kann durch intrazelluläre Signale, wie DNA- und Mitochondrien-Schäden sowie von Tumorsuppressor p53 als auch durch Chemotherapeutika aktiviert werden. Hingegen wird der extrinsische Signalweg durch die spezifische Bindung von Todesliganden an membranständige Todesrezeptoren induziert. Dies führt nach Oligomerisierung der Todesrezeptoren, zur Bildung des *death-inducing signaling complex* (DISC) und damit zur Aktivierung der Caspasen-Kaskaden.

*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL/APO2L) gehört zur TNF-Superfamilie und bindet an die Todesrezeptoren (TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5). Die Fähigkeit von TRAIL, in einer Vielzahl von Tumorzellen spezifisch Apoptose auszulösen, wobei nur eine geringe Toxizität in normale Zellen zu beobachten ist, empfiehlt diese Liganden als besonders vielversprechend für zukünftige Krebstherapien. Preklinische Studien belegten bereits das Therapie-Potenzial von TRAIL in Mäusen und in Primaten, wenn es einzeln oder in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt wurde. Die Suppression von xenotransplantierten Tumoren ohne ersichtliche Zeichen von systemischer Toxizität, qualifizierte TRAIL ebenfalls als eine viel versprechende Strategie für Krebstherapien. Klinische Studien mit TRAIL oder agonistischen monoklonalen DR4 und DR5-Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren wurden bereits bei Patienten mit einigen soliden Tumoren eingeleitet, wobei bisher das maligne Melanom von diesen klinischen Studien ausgeschlossen war.

In dieser Untersuchung wurde sowohl die Expression der Todesrezeptoren DR4 und DR5 *in vitro*, ihre Funktionalität als auch ihre Expression in Melanomzelllinien *in vivo* nachgewiesen. Mögliche Mechanismen der TRAIL-Resistenz wurden mit der Untersuchung von TRAIL-

induziertem NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappaB) als auch mit der Etablierung Zell- Kulturmodells der TRAIL-Resistenz durchgeführt.

In den Untersuchungen zeigte sich eine durchgehende Expression von DR5, wohingegen DR4 nur bei zwei von sieben Zelllinien gefunden wurde. Aber starke Sensitivität gegen TRAIL zeigte sich insbesondere bei DR4-positiven Melanomzelllinien, während DR4-negativen Zellen geringere und verzögerte Apoptose zeigten oder komplett resistent waren. Die Verwendung von spezifischen, blockierenden DR4/DR5-Antikörpern belegte die dominierende Rolle von DR4 bei Melanomzelllinien in eindeutiger Weise. Die Signifikanz dieser Daten für die in vivo Situation wurde mittels immunhistochemischer Untersuchungen untermauert, und damit wurde zum ersten Male die Bedeutung der Expression von DR4 und DR5 in primären Tumoren gezeigt.

Apoptose-Resistenz ist für Krebstherapien ein grundsätzliches Problem. In verschiedenen Untersuchungen wurde Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose gefunden und wurde mit anti-apoptotischen Proteinen wie c-FLIP, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 und IAP1/2 korreliert. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wurde als entscheidend für die TRAIL-Resistenz vorgeschlagen, weil die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl-x<sub>L</sub>, c-FLIP, und XIAP Krebszellen vor TRAIL-induzierter Apoptose bewahren kann. Neben anderen TNF-Liganden zeigt auch TRAIL eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

In dieser Untersuchung wurde bei Apoptose-sensitiven Zelllinien mit DR4-Expression eine hohe TRAIL-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivität gezeigt, während sich in DR4-negativen (DR5-positiven) Melanomzelllinien keine durch TRAIL-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivität fand, unabhängig von ihrer Sensitivität. Die erhöhte TRAIL-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivität in DR4-positiven Zellen führte jedoch zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie c-FLIP, Bcl-x<sub>L</sub>, XIAP, Survivin und Livin. Stattdessen bewirkte die TRAIL-Stimulation eine Reduzierung der DR4-Expression in einer der Zelllinien. Diese Wirkung von TRAIL konnte durch den *Proteasomen-Inhibitor* (LLnL) verhindert werden. In der Regel führte LLnL zu einer erhöhten TRAIL-Sensitivität bei Melanomzelllinien, unabhängig von einer TRAIL-induzierten NF- $\kappa$ B Aktivität.

In selektierten TRAIL-resistenten Melanomzelllinien zeigte sich weder ein Anstieg der NF- $\kappa$ B Aktivität noch eine Veränderung der Expression von antiapoptotischen Proteinen nach Stimulation mit TRAIL. Die DR4-positiven selektierten Melanomzelllinien erlangten einen Monat nach TRAIL-Entzug ihre Sensitivität gegen TRAIL-induzierte Apoptose wieder zurück, während die DR4-negativen Zellen auch nach längerer Kultivierung ohne TRAIL resistent blieben.

In selektierten, TRAIL-resistenten Melanomzelllinien fand sich eine signifikante Herabregulation der Expression von proapoptotischen Proteinen wie Caspase-8, Caspase-10 und DR4 aber nicht von DR5. Die Bedeutung dieser proapoptotischen Faktoren zeigte sich nach Exogener Überexpression von Initiator-Caspasen und von DR4, wodurch die Sensitivität von selektierten Melanomzelllinien teilweise zurückgewonnen werden konnte.

Aufgrund der hohen DR4-induzierten Apoptose *in vitro* und starken DR4 Expression *in vivo* in Melanomzelllinien sollte die Anwendbarkeit von TRAIL und besonders von DR4-basierten Strategien für die Behandlung des malignen Melanom neu beurteilt werden. Die Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzelllinien hängt unter anderem von der Herabregulation der Initiator-Caspasen und von DR4 in Melanomzelllinien ab. Antiapoptotischen Proteine, die von TRAIL-induziertem NF- $\kappa$ B reguliert werden könnten, besitzen dahingegen eher keine Relevanz.

Die Expression dieser Faktoren könnte verstärkt werden durch Proteasomen-Inhibition, was die TRAIL-induzierte Herabregulation von DR4 verhindert (hier gezeigt), durch Chemotherapeutika, durch welche die Expression von TRAIL-Rezeptoren hochreguliert werden kann oder durch Interferon- $\gamma$ , für welches gezeigt wurde, dass es die Expression von Caspasen hochregulieren kann.

Da aktuelle Chemotherapeutika Patienten mit metastasiertem malignem Melanom nur mit stark eingeschränkter Effizienz erreichen, sind neue therapeutische Substanzen notwendig. TRAIL könnte eine viel versprechende Möglichkeit bieten. Infolge einiger widersprechender Arbeiten in der Literatur wurde das Potential von TRAIL-basierten Strategien bei Patienten mit malignem Melanom bisher nicht erkannt. Diese Arbeit könnte zu einem verbesserten Verständnis für die Möglichkeiten von TRAIL in der Melanomtherapie beitragen.