

Aus dem Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und der  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Charité - Universitätsmedizin Berlin

# **Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels eines selektiven Aurorakinase-A-Inhibitors**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Cyprienne Isabell Geilen  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2016  
Journal-Nr.: 3846

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Achim Gruber  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Jürgen Eberle  
Dritter Gutachter: PD Dr. Soroush Sharbati

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

melanoma; therapy; pathogenesis; apoptosis; cytotoxicity; cell survival;  
(MeSH)kinases; tnf-related apoptosis-inducing ligand; cell culture; membrane  
potential, mitochondrial (MeSH); flow cytometry; western blotting

Tag der Promotion: 15.12.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-802-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**Für alle Charlys und Sophies**





# Inhalt

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Das maligne Melanom beim Menschen</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.1 Melanomtherapie beim Menschen</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 Apoptose</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.1 Signalwege der Apoptose</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.2 Der extrinsische Signalweg</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.3 Der intrinsische Signalweg</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.4 Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2.5 Apoptoseregulation durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS)</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.6 Caspasen</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.7 Rolle der Caspasen in der Apoptose</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.8 Kontrollmechanismen der Caspasen</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 TRAIL und seine Rezeptoren</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.1 Aktivierung alternativer Signalwege durch TRAIL</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.2 Resistenzentwicklung gegenüber TRAIL</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.3 Therapeutischer Einsatz von TRAIL</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4 Aurorakinasen</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4.1 Aurorakinase Inhibitoren</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 Verwendete Zelllinien und ihre Kultivierung</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.1 Zelllinien</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.2 Zellkultur – Kultivierung</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.3 Einfrieren von Zellen</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Verwendete Reagenzien</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3 Verwendete Antikörper</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4.1 Durchflusszytometrie</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4.2 Nachweismethoden - Apoptose</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.3 Nachweismethode - Viabilität/Vitalität</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.4 Nachweismethode - Zytotoxizität/Nekrose</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.5 Nachweis Proliferation - Wachstumskurven</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4.6 Nachweismethode - mitochondriales Membranpotential (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4.7 Nachweismethode - ROS (reactive oxygen species)</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4.8 Protein Analyse (Western-Blot)</b> .....	<b>37</b>

3.4.9 Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysepuffer .....	38
3.4.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Methode .....	38
3.4.11 Elektrophorese-Protokoll .....	39
3.4.12 Verwendete Antikörper: Western-Blot Analyse.....	41
3.4.13 Herstellung von Zellfraktionierungslysaten .....	42
3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	43
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
4.1 Basisexpression von Aurorakinase-A in verschiedenen Melanomzelllinien.....	44
4.2 Wirkung des AURKA-Inhibitors Alisertib auf die Zellproliferation von Melanomzelllinien.....	46
4.3 Alisertib sensitiviert für die TRAIL-induzierte Apoptose.....	47
4.4 Überprüfung der Zellviabilität .....	56
4.5 Überprüfung der Toxizität von Alisertib in Melanomzellen .....	57
4.6 Einfluss von Alisertib auf die Aktivierung der Caspasenkaskade.....	59
4.7 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges.....	66
4.8 Einfluss von Alisertib auf die Expression von Bcl-2 Proteinen .....	69
4.9 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach Behandlung mit Alisertib.....	70
4.10 Aktivierung von p53 und p21 durch Alisertib .....	74
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.1 Bedeutung von Zellkulturmodellen im Melanom.....	77
5.2 Die Bedeutung von Aurorakinase-Inhibitoren und TRAIL in der Tumor-therapie und Effekte von Alisertib MLN 8237 in Melanomzellen .....	78
5.3 Keine Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch Alisertib.....	81
5.4 Aktivierung des extrinsischen Signalweges durch Alisertib .....	82
5.5 Die Rolle des Tumorsuppressors p53 bei der durch Alisertib-vermittelten Sensitivierung für die TRAIL induzierte Apoptose .....	83
5.6 Die mögliche Bedeutung der Kombination von Alisertib und TRAIL für den therapeutischen Einsatz von TRAIL für die Melanomtherapie.....	84
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels eines selektiven Aurorakinase-A-Inhibitors .....	86
<b>Summary.....</b>	<b>87</b>
Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by a selective Aurora-kinase-A-inhibitor .....	87
<b>6. Literatur .....</b>	<b>88</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>105</b>

# 1. Einleitung

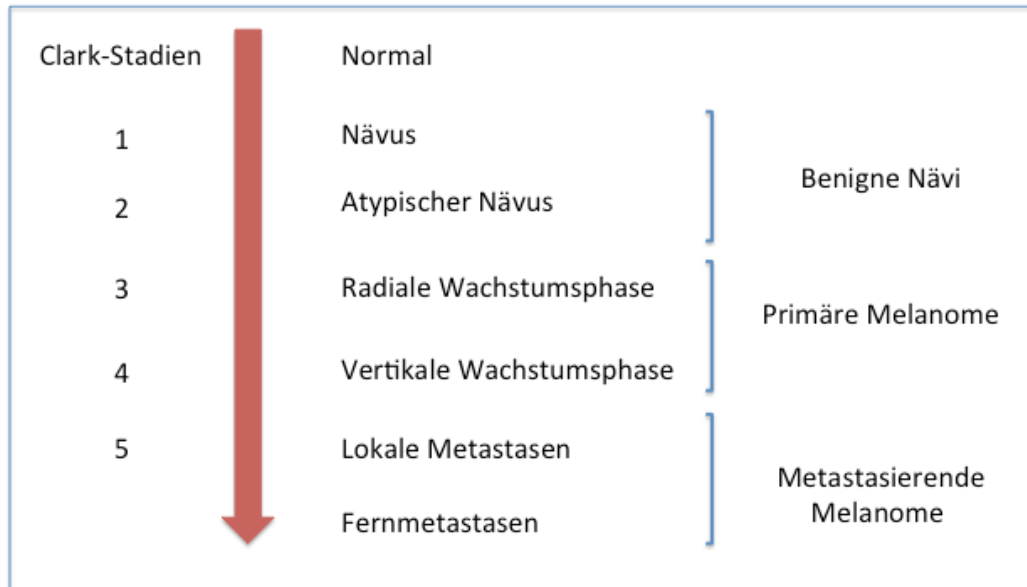
---

## 1.1 Das maligne Melanom beim Menschen

Das maligne Melanom ist ein, im Vergleich zu anderen Hautkrebsarten selten auftretender aber sehr aggressiver und mit hoher Mortalität verbundener Hauttumor beim Menschen. Dabei wird das maligne Melanom weltweit immer häufiger diagnostiziert und es war ein dramatischer Anstieg während der letzten Jahrzehnte zu verzeichnen. Innerhalb der EU wurde ein Anstieg an betroffenen Patienten von jährlich 3-7 % festgestellt (de Braud et al., 2003). Trotz dieses Anstieges in der Prävalenz konnten Prognose und Überlebensraten seit den 60iger Jahren ständig verbessert werden. Hier spielen Früherkennung und, damit verbunden, frühzeitiges chirurgischen Einschreiten eine tragende Rolle (Gremel et al., 2009; Bandarchi et al., 2010). Weiterhin muss für Patienten mit einem fortgeschrittenen oder metastasierten Melanom eine sehr vorsichtige Prognose gestellt werden. Laut Tumorstatistik des National Cancer Institute, nimmt die 5-Jahres Überlebensrate, die für Patienten mit lokalen Melanomen bei etwa 99 % liegt, auf nur 16 % für Patienten mit Metastasen dramatisch ab (Gremel et al., 2009).

Bei der Entstehung von Melanomen tragen Transformation und Proliferation entscheidend zur malignen Entartung von Melanozyten bei. Diese pigmentproduzierenden Zellen, die in der basalen Zellschicht der Epidermis zu finden sind, bilden primäre Melanome aus Vorläufer-Läsionen (Lentigo maligna, dysplastische Naevuszellnävi, kongenitale Nävi) oder direkt als Neubildungen (de Braud et al., 2003; Dahl und Guldborg, 2007; Bandarchi et al., 2010). Die Entstehung und das Voranschreiten im Wachstum wird von einer Reihe histologischer Veränderungen begleitet, die mit dem 5-stufigen Clark-Model (Clark, 1991) beschrieben werden (Abb. 1). Stadium 1 benennt Nävi, also gutartige Läsionen, die durch eine vermehrte Anzahl von unregelmäßig angeordneten Melanozyten charakterisiert sind. Stadium 2 umfasst dysplastische Nävi, die zufällige, atypische zytologische Veränderungen aufweisen. Stadium 3 beinhaltet Melanome in der radialen Wachstumsphase (radial growth phase – RGP). Hier breiten sich die Zellen lokal invasiv aus und infiltrieren vereinzelt die Dermis. In der anschließenden Wachstumsphase (vertical growth phase – VGP; Clark-Stadium 4) infiltrieren Melanomzellen in Form von „Clustern“ die Dermis und das subkutane Fettgewebe. Hierdurch findet auch die Invasion in Blut- und Lymphgefäße statt und führt deshalb zu einer Erhöhung des Metastasierungsrisikos. Die Fernmetastasierung ist der letzten Schritt und wird mit dem Stadium 5 beschrieben (Clark, 1991; Dahl und Guldborg, 2007; Gremel et al., 2009). Die Fernmetastasierung erfolgt vorwiegend über das

Lymphsystem (Lymphknoten) sowie den Blutweg mit Fernmetastasen vor allem in Gehirn, Leber, Lunge und Skelettsystem.



**Abbildung 1: Stadien der Melanomprogression.** Melanozyten sind in der basalen Schicht der Epidermis zu finden. In der radialen Wachstumsphase (Stadium 3) filtrieren die Zellen eher die Epidermis, während sie in der vertikalen Wachstumsphase die Basalmembran durchdringen und die Dermis und das subkutane Fettgewebe infiltrieren (Stadium 4) bevor sie dann metastasieren (Stadium 5) (Gremel et al., 2009).

Die Entstehung eines Melanoms wird durch exogene und endogene Faktoren begünstigt. Ein heller Hauttyp (Hauttyp I und II), eine hohe Sonnenlichtexposition (hauptsächlich UV-B-Strahlung), starke Sonnenbrände, eine hohe Anzahl von Muttermalen, familiäre Disposition, Immunsuppression und ein höheres Lebensalter wurden als Risikofaktoren identifiziert. Es wird angenommen, dass 65 % aller Melanome auf intensive Sonnenlichtexposition zurückzuführen sind (de Braud et al., 2003; Bandarchi et al., 2010; Pacheco et al., 2011). Das maligne Melanom charakterisiert, neben der hohen Mortalität, auch eine hohe Apoptose- und Chemotherapeutikaresistenz. Damit ist das Auftreten von Fernmetastasen auch Jahre nach der Entfernung des Primärtumors möglich (Garbe und Leiter, 2009).

Die sogenannten ABCD-Kriterien wurden von den National Institutes of Health (NIH) entwickelt, um möglichst frühzeitig veränderte Läsionen diagnostizieren zu können und so

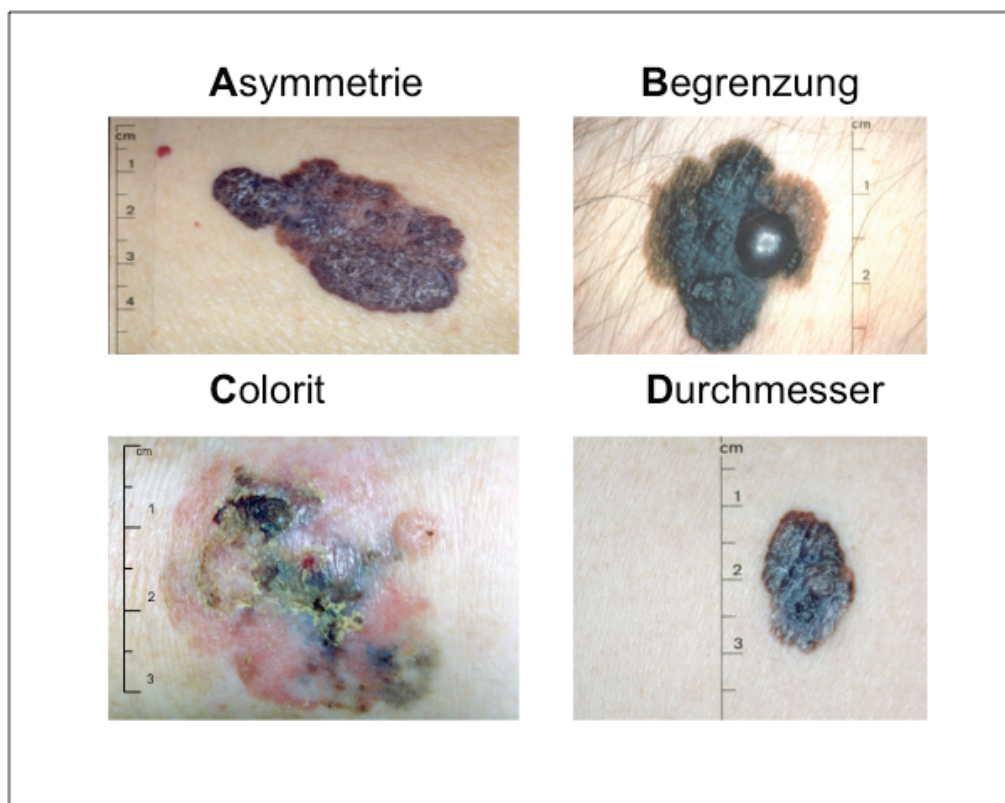
die Entwicklung von Melanomen zu verhindern bzw. diese frühzeitig zu diagnostizieren (Masci und Borden, 2002; de Braud et al., 2003). Man berücksichtigt dabei folgende Kriterien:

**Asymmetry** - Asymmetrie: Die Läsion lässt sich in zwei gleiche Hälften teilen (Abb. 2A).

**Border irregularity** - unregelmäßige Begrenzung: Die Ränder der Läsion sind unregelmäßig und/oder gezackt oder ausgefranst (Abb. 2B).

**Color variability** - Farbveränderungen: Keine einheitliche Färbung; rote, braune, bläuliche, schwarze und/oder ungefärbte Bereiche (Abb. 2C).

**Diameter** - Durchmesser: Der Durchmesser der Läsion beträgt mehr als 5 mm oder vergrößerte sich signifikant in nur kurzer Zeit (Abb. 2D).



**Abbildung 2: Die ABCD-Kriterien beim malignen Melanom.**

*A: Assymetrie*

*B: Begrenzung*

*C: Farbe*

*D: Durchmesser*

*Die klinischen Bilder wurden von Christoph C. Geilen zur Verfügung gestellt*

Das maligne Melanom wird aufgrund von Wachstumskriterien in folgende vier Haupttypen untergliedert (de Braud et al., 2003; Bandarchi et al., 2010).

### *Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)*

Die häufigste Form des malignen Melanoms ist dadurch charakterisiert, dass die Läsion stark pigmentiert und anfangs flach ist, sowie asymmetrisch und ungleichmäßig wächst. Die Läsion wird im späteren Stadium zu einem asymmetrischen Fleck mit klaren Rändern und einer ungleichmäßigen Färbung. Diese Art von Melanomen kann sehr langsam und über Jahre wachsen.

### *Noduläres Melanom*

Das noduläre Melanom ist, wie der Name schon sagt, ein Knoten mit scharfen Abgrenzungen zur umliegenden Haut und einer dunkleren häufig einheitlichen Pigmentierung. Diese Läsion ist durch ein frühes vertikales Wachstum und schnelle Invasion in die Dermis charakterisiert. Diese Läsionen treten häufiger beim Mann auf und sind überwiegend am Rumpf, Kopf und Nacken zu finden. Sie zeichnen sich durch hohe Aggressivität aus.

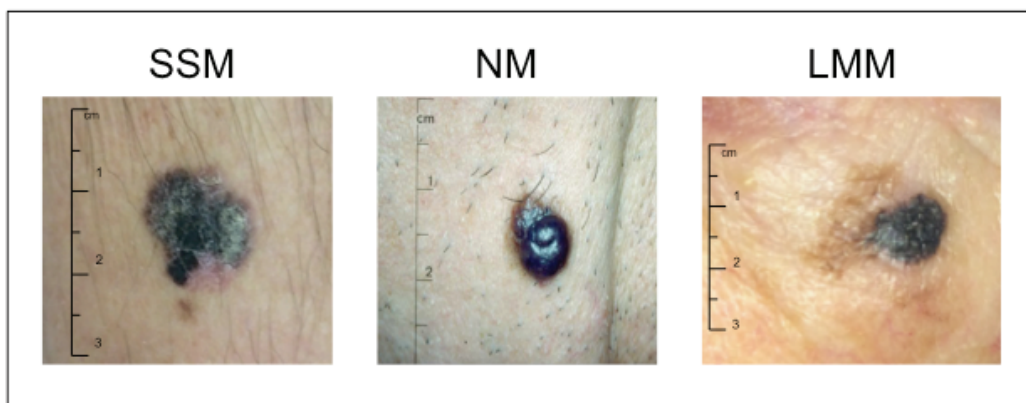
### *Lentigo maligna-Melanom (LMM)*

An sonnenexponierten Hautarealen wie dem Gesicht und den Oberarmen tritt diese Variante häufig auf. Besonders ältere Patienten sind betroffen, wobei das LMM nur 5% der Melanome ausmacht. Das LMM entwickelt sich aus linsenförmigen malignen Läsionen, die auch Hutchinson-Flecken genannt werden. Charakteristisch ist ein langsames Wachstum, infolgedessen es auch nur in seltenen Fällen metastasiert. Typisch sind große, braunschwarze Läsionen.

### *Akrolentiginöses Melanom*

Diese Melanomform tritt an Händen, Füßen oder unter den Nägeln auf und neigt zur Ulzeration. Es ist selten bei hellen Hauttypen zu finden und repräsentiert etwa 35% aller Melanome, die sich bei dunkelhäutigen, lateinamerikanischen und asiatischen Menschen ausbilden (Abb.3).

Neben diesen vier Hauptformen existieren weitere seltene Melanomformen. Das Uvea-Melanom tritt in der pigmenttragenden Schicht der mittleren Augenhaut (Uvea) auf und ist eine relativ seltene Form des Melanoms. Zu den seltenen Formen gehört auch das Schleimhaut-Melanom, das in allen Schleimhäuten, also im Mund, im Genitalbereich, dem Respirations- oder dem Gastrointestinaltrakt auftreten kann und das neurotrope Melanom, eine großflächige Läsion im Kopf-Halsbereich, die sich durch atypische Melanozyten und in der Immunhistologie durch Melan-A-Negativität auszeichnet. Andere seltene Varianten sind das amelanotische Melanom, bei dem aufgrund der Entartung der Zellen kein Pigment mehr gebildet wird. Dadurch ist es besonders tückisch, weil es oft erst sehr spät erkannt wird und dann bereits metastasiert ist. Das polyploide Melanom hat eine multilobuläre Gestalt und wächst zum größten Teil über die Oberfläche der Epidermis hinaus. Es ist häufig auf dem Rücken lokalisiert.



**Abbildung 3: Unterteilung des Melanoms in mehrere Haupttypen.**

- A. *Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)*
- B. *Noduläres Melanom (NM)*
- C. *Lentigo malignes Melanom (LMM)*

*Die klinischen Bilder wurden von Christoph C. Geilen zur Verfügung gestellt*

Neben der genannten morphologischen Klassifikation kann auch eine histologische Klassifikation erfolgen. Die histologische Klassifikation eines malignen Melanoms berücksichtigt die Tumordicke, die Tiefeninvasion des Primärtumors und die Metastasierung. Dafür wird die Tumordicke nach Breslow und die Invasionslevel nach Clark herangezogen. Die Tumordicke nach Breslow umfasst die absolute Dicke des Tumorgewebes von der Granularzellschicht (*Stratum granulosum*) der Epidermis bis zum tiefsten noch nachweisbaren Tumorgewebe (Breslow, 1970). Die Invasionslevel nach Clark bestimmen die Eindringtiefe des Tumors in die verschiedenen Schichten der Haut (Clark et al., 1969).

- Level I: In situ: Die Gesamtheit der Tumorzellen befindet sich oberhalb der Basalmembran, innerhalb der Epidermis.
- Level II: Überschreitung der Basalamembran und Invasion in die Papillenschicht (*Stratum papillare*) der Dermis
- Level III: Invasion bis an die Grenze zur Netzschicht (*Stratum reticulare*) der Dermis
- Level IV: Invasion in die Netzschicht
- Level V: Invasion in das Unterhautfettgewebe

Schließlich lässt sich die allgemein gültige TNM-Klassifikation nach Harmer und Denoix auch für das Melanom anwenden. T steht für die Ausbreitung und das Verhalten des Primärtumors; N steht für die Lymphknoten (engl. nodes) besonders in Bezug auf regionäre Lymphknotenmetastasen; M steht für Metastasen in Bezug auf Fernmetastasen (Harmer et al., 1970).

### 1.1.1 Melanomtherapie beim Menschen

Grundsätzlich ist die Früherkennung eines malignen Melanoms für den Therapieerfolg maßgeblich. Die vollständige chirurgische Entfernung des Primärtumors im Stadium I führt bei betroffenen Patienten zu einer Überlebensrate von über 90%. Wenn es im fortgeschrittenen Stadium bereits zur Metastasierung in verschiedene Organe wie Lunge, Leber, Knochen oder Gehirn gekommen ist, schränkt das die Möglichkeiten einer operativen Entfernung stark ein (Gremel et al., 2009). Die geringe Überlebensrate und damit verbundene schlechte Prognose für die Betroffenen ist vor allem auf die hohe Chemotherapeutika-Resistenz beim metastasierten Melanom zurückzuführen. Diese hohe Resistenz ist u.a. mit Defekten in der proapoptotischen Signalkaskade in Melanomzellen zu erklären. Es bestehen molekulare Veränderungen im Apoptosesignalweg, wie die



Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren (Soengas und Lowe, 2003), die Reaktivierung von Überlebenssignalen (Eberle et al., 2007) und die Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren (Soengas und Lowe, 2003).

Zur Therapie des malignen Melanoms standen bis zum Jahr 2011 nur drei von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA = Food and Drug Admistration) zugelassene Substanzen zur Verfügung. Dacarbazin (DITC), das 1975 zugelassen wurde, hochdosiertes Interleukin-2 (IL-2) zur Immuntherapie, zugelassen 1998 und Ipilimumab (anti-CTLA-4-Antikörper), zugelassen 2011. Häufig wird auch Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) zur Therapie eingesetzt, oder eine Kombination aus IL-2 und IFN- $\alpha$ . Bei der Behandlung mit DITC und IL-2 und/oder IFN- $\alpha$  zeigten sich nur geringe Ansprechraten, die häufig mit hohen Nebenwirkungen verbunden sind und keinen positiven Effekt auf die Gesamtüberlebensrate hatten (Mouawad et al., 2010; Pacheco et al., 2011). Dies macht die Entwicklung neuer, wirksamer Substanzen und Strategien mehr als notwendig. Hoffnungsvolle Therapieansätze und Therapiestrategien sind daher die Gruppe der Signalkaskaden-Inhibitoren. Ein Beispiel ist die Inhibition der Rezeptortyrosinkinase (RTK) c-KIT, da die Aktivierung von c-Kit zur Stimulation des MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), des PI3K-Akt/PKB- und des JAK-STAT-Signalweges führt. Imatinib (Zulassung 2001), ein Tyrosinkinase-Inhibitor, wies bessere Ansprechraten, eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bis zu sechs Monate, Tumorrückgang und als erste medikamentöse Therapie beim Melanom ein verbessertes Gesamtüberleben (ein Jahr; 51% der Patienten) auf (Nikolaou et al., 2012).

Der Ras-Signalweg ist ebenfalls von zentralem Interesse in der Melanom-Forschung, da die Signalkaskade das Überleben der Zellen, die Proliferation und die Invasion durch zwei verschiedene Signalwege, den MAPK- und den PI3K-Akt/PKB-Signalweg, unterstützt. Bis zu 20% der Melanome weisen eine Mutation von N-Ras auf. Damit war Ras eine vielversprechende Zielstruktur für die Behandlung von Melanomen aber auch anderer Tumorarten. Leider haben Phase II Studien mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor Ionafarnib, der die Translokation von Ras an die Plasmamembran hemmt, keine überzeugenden Ergebnisse gebracht. Es wurde aber darauf hingewiesen, dass die Ras-Inhibition die Effizienz von anderen Therapieansätzen, wie Cisplatin oder Sorafenib, synergetisch verstärken kann (Nikolaou et al., 2012).

B-RAF ist das am häufigsten mutierte Onkogen im Melanom. An die 60% aller Melanome weisen eine aktivierende B-RAF-Mutation auf. Selektive B-RAF-Inhibitoren wie zum Beispiel PLX4032/ Vemurafenib (Zulassung 2012) zeigten ein 80%-iges Ansprechen in Phase I Studien und in Phase III Studien sowie ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Patienten, die mit Dacarbazin (DTIC) behandelt wurden (Flaherty et al., 2010; Pacheco et al., 2011; Nikolaou et al., 2012). Auch selektive Inhibitoren gegen

MEK-Kinasen wie zum Beispiel AZD6244 zeigten vielversprechende Wirkungen in Melanompatienten. Der Nachteil von Kinaseinhibitoren liegt in der Resistenzentwicklung gegen sie, da alternative Signalwege aktiviert werden können. Die Bestimmung des Mutationsstatus der einzelnen Patienten macht diese Therapien individualisierbar aber auch aufwendiger (Blank et al., 2011). Weitere Therapiestrategien sind die Hemmung antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-2 oder Mcl-1 sowie die Aktivierung von Tumorsuppressoren und die Blockierung der Angiogenese von Tumoren mit spezifischen Antikörpern und die Immuntherapie (Blank et al., 2011). Die momentan aktuellste und wirkungsvollste Therapieoption stellt der Antikörper PD-1, dar (Zulassung 2014) mit Ansprechraten von bis zu 41%. Die Wirkungsweise des Antikörpers basiert auf der Blockierung der Interaktion von PD-1 und seinem Liganden PDL1, der von Zellen des Tumorstromas und von Tumorzellen selbst gebildet wird. Durch die Blockierung wird die immunsuppressive Wirkung des Liganden abgeschwächt und die T-Zell-Antwort gegen das Tumorgewebe gestärkt (Topalian et al., 2012).

### 1.2 Apoptose

Das Wort Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod und ist abgeleitet von dem altgriechischen Wort ἀποπτειν = *apoptein*, welches mit dem Wort „Abfallen“ zu übersetzen ist. Dieser Prozess wurde 1842 von Carl Vogt beim Studium der Entwicklung von Kaulquappen (Vogt, 1842) entdeckt und beschrieben. Die Bedeutung dieses Vorganges wurde allerdings erst über 100 Jahre später erkannt und unter dem Begriff Apoptose bekannt. Die Biologie verwendet den Begriff, um das physiologische Absterben von Zellen nach einem bestimmten Muster zu beschreiben und spricht daher auch vom programmierten Zelltod (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980).

Die Apoptose ist ein evolutionär hoch konservierter Mechanismus und von essentieller Bedeutung für das zelluläre Gleichgewicht, die Zellhomoöstase und die Embryogenese (Koolman und Röhm, 2003; Brenner et al., 2008). Die Apoptose ist ein aktiver, ATP-verbrauchender und regulierter biochemischer Prozess. So können Zellen ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde gehen. Jede Zelle mehrzelliger Organismen verfügt über die Möglichkeit, Apoptosesignalwege zu aktivieren und aus dem Zellverbund entfernt zu werden.

Die Apoptose ist durch bestimmte morphologische und biochemische Veränderungen genau definiert und wird häufig von einer Familie von Proteasen, den sogenannten Caspasen vermittelt. Betroffene Zellen schrumpfen, die DNS wird fragmentiert und es kommt zur Chromatin-Kondensation wobei die Zellmembran erhalten bleibt. Es schnüren sich exozytotisch Membranvesikel, die Zellfragmente enthalten, von der Plasmamembran ab. Man bezeichnet sie als apoptotische Körperchen (apoptotic bodies). Die Zelltrümmer und

Zellreste werden von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen aufgenommen und damit wird verhindert, dass zytosolische Bestandteile in den extrazellulären Raum gelangen und Entzündungsreaktionen auslösen (Hengartner, 2000; Johnstone et al., 2002; Harada und Grant, 2003; Tait und Green, 2010). Dies unterscheidet die Apoptose von anderen Formen des Zelltodes, wie der Nekrose, bei der es zu Zellschäden und Entzündungsreaktionen des umliegenden Gewebes kommt, da die Zellen zerfallen. Darüber hinaus unterscheidet sich die Nekrose von der Apoptose auch dadurch, dass sie energieunabhängig stattfindet. Anders als die Apoptose erfolgt die Nekrose nicht nach einem Signalkaskadenplan, sondern kann durch vielfältige Ereignisse, wie Verletzungen des Gewebes (mechanische Zerstörung) aber auch durch andere physikalische und chemische Reize (Hypoxie, Ischämie, bakterielle Infektion) ausgelöst werden (Leist und Jaattela, 2001).

Apoptose-Dysregulation spielt bei verschiedenen Erkrankungen eine bedeutende Rolle, wie zum Beispiel bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Bei der Apoptose-Dysregulation erfolgt teilweise eine Verstärkung der Apoptose, aber auch ein Ausbleiben von Apoptose, so kann zum Beispiel eine fehlende Apoptose bei der Lymphozytenentwicklung zu Autoimmunerkrankungen führen (Goldin und Landgren, 2009). Der Zusammenhang zwischen Apoptoseunterdrückung und maligner Entartung von Zellen ist zweifelsfrei belegt (Vermeulen et al., 2005). Tumorzellen entziehen sich dadurch der Selbstkontrolle, sowie auch der Kontrolle des Immunsystems (Igney und Krammer, 2002; Kim et al., 2005). Zur Blockierung der Apoptosesignalwege kommt es entweder durch inaktivierende Mutationen proapoptotischer Gene oder durch Überexpression antiapoptotischer Faktoren. Die Entstehung von Therapieresistenzen bei vielen Tumorentitäten ist oft auf eine Apoptosedefizienz zurückzuführen. (Eberle et al., 2007; Fulda, 2009).

### 1.2.1 Signalwege der Apoptose

Die Apoptose ist ein mehrfach regulierter und kontrollierter Vorgang und kann über verschiedene Wege aktiviert werden. Häufig münden diese verschiedenen Signale aber in zwei verschiedene Apoptosesignalwege, dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg. Beiden Wegen gemeinsam ist die Endstrecke, die zur Fragmentierung zellulärer Strukturen und zum morphologischen Korrelat der Apoptose führt.

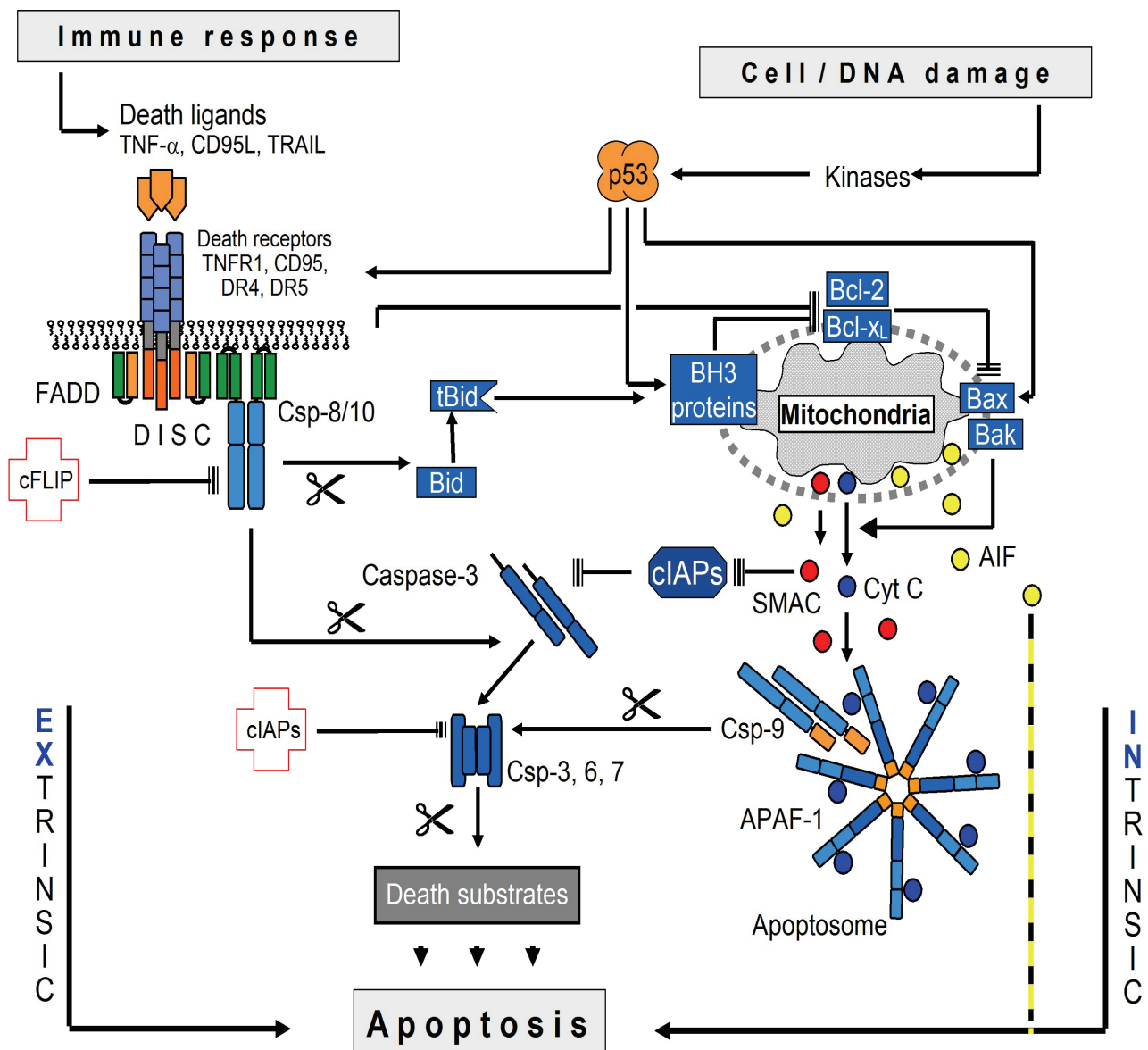
Der extrinsische Signalweg wird über Todesrezeptoren wie TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) oder CD95 (Cluster of Differentiation 95) vermittelt, der intrinsische Signalweg wird durch zellulären Stress (DNS-Strangbrüche, p53) induziert und führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Fulda und Debatin, 2006; Tait und Green, 2010). Über das Bcl-2-Protein Bid (BH3-interacting domain death agonist) sind beide Signalwege miteinander verbunden (Youle und Strasser, 2008).

Die Aktivierung von Proteasen (Caspasen) und die Spaltung von Todessubstraten führt anschließend zum Zelltod (Fischer et al., 2003; Riedl und Shi, 2004).

### 1.2.2 Der extrinsische Signalweg

Durch die Bindung von Todesliganden (CD95L, TRAIL oder TNF- $\alpha$ ) an die entsprechenden Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (CD95, TRAIL-R1, -R2 oder TNF-R1) wird der extrinsische Weg der Apoptose induziert. Dies kann zur Aktivierung der Caspasensignalkaskade führen (Wang und El Deiry, 2003; Lavrik et al., 2005; Krammer et al., 2007), darüberhinaus aber auch zu der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges. Durch Bindung der Todesliganden an ihre Rezeptoren kommt es zu einer Oligomerisierung der Todesrezeptoren und intrazellulär zur Ausbildung des DISC (englisch: Death Inducing Signaling Complex), eines proapoptotischen Multiproteinkomplexes, sowie der Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -10 (Krammer et al., 2007).

Die Procaspasen-8 und -10 werden durch das Adapterprotein FADD (englisch: Fas-associated death domain protein) an die zytoplasmatische Todesdomäne des Todesrezeptors gebunden (Nunez et al., 1998; Wang et al., 2005). In Typ I-Zellen (z.B. Lymphozyten) kann dies direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen führen, was zur Spaltung von Todessubstraten wie ICAD (englisch: Inhibitor of Caspase Activated DNase) und PARP (englisch: Poly-(ADP-ribose)-polymerase) und letztendlich zur Fragmentierung der DNS und damit zum Zelltod führt.



**Abbildung 4: Hauptsignalwege der Apoptose** (verändert nach Eberle et al., 2007) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der beiden Apoptosewege.

Mit freundlicher Genehmigung von J. Eberle

### 1.2.3 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird auch als mitochondrialer Apoptosesignalweg bezeichnet, da hier Mitochondrien eine zentrale Rolle spielen. Als Kraftwerke der Zelle sind sie einerseits für die Energieproduktion zuständig, andererseits aber auch für den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Kroemer et al., 2007; Fulda, 2010). Durch Zell- oder DNS-Schäden, Hypoxie, eine Chemotherapie oder durch Interaktionen mit dem extrinsischen Signalweg wird der intrinsische Signalweg aktiviert (Ziegler und Kung, 2008; Tait und Green, 2010). Durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und dem Verlust des

mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\psi_m$  kommt es zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren, beispielsweise Cytochrom C, aus den Mitochondrien in das Cytoplasma (Gonzalvez und Ashkenazi, 2010). Die Cytochrom C-Freisetzung gilt als irreversibler Schritt im intrinsischen Signalweg (Tait und Green, 2010). Neben Cytochrom C werden auch der proapoptotische Faktor SMAC (engl.: Second mitochondrial activator of caspases) und AIF (engl.: Appoptosis-inducing factor) aus den Mitochondrien freigesetzt.

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges (Green und Kroemer, 2004). Freigesetztes Cytochrom C bindet im Cytosol an Apaf-1 (englisch: appoptotic protease- activating factor-1) und führt, zusammen mit Caspase-9, zur Bildung des sogenannten Apoptosoms, eines Multiproteinkomplexes, der wiederum zur Aktivierung der Caspase-9 führt. Caspase-9 spaltet Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) und aktiviert diese (Riedl und Shi, 2004; Chipuk et al., 2010).

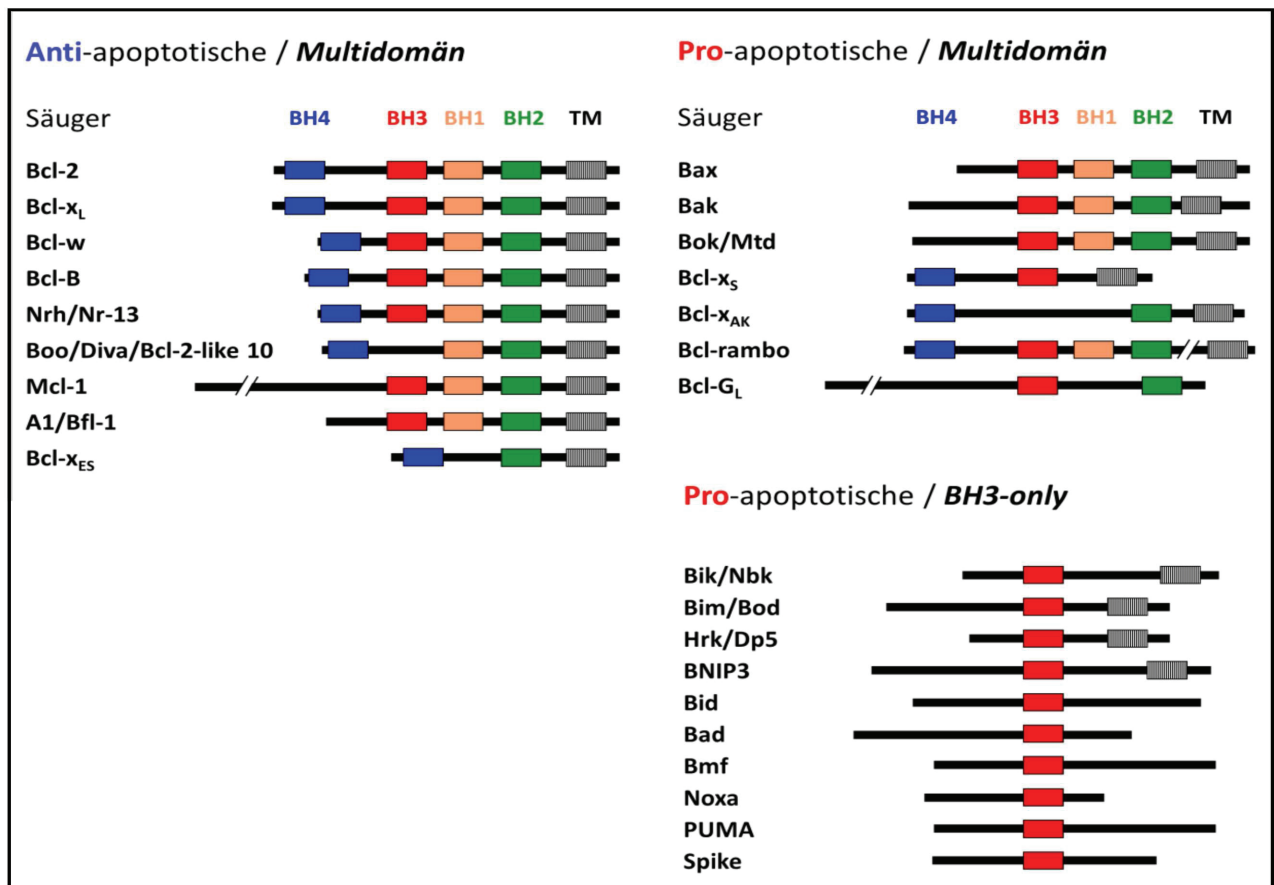
Die Caspasen-abhängige Apoptose wird durch SMAC, durch Blockierung der Aktivität von Caspaseinhibitoren, den sogenannten cIAPs (engl.: cellular inhibitor of appoptosis proteins) (Fulda und Vucic, 2012) unterstützt. SMAC und AIF werden auch als Ursache für eine Caspasen-unabhängige Apoptose aufgeführt, dies wird allerdings immer wieder kritisch und kontrovers diskutiert (Cande et al., 2004). AIF ist unter physiologischen Bedingungen im Intermembran-Raum der Mitochondrien lokalisiert und wirkt dort als NADH-Oxidase in der Elektronentransportkette. Es katalysiert die Caspasen-unabhängige Apoptose nach Translokation in den Kern durch Chromatin-Kondensation und Fragmentierung der DNS (Norberg et al., 2010). Der mitochondriale Apoptosesignalweg gilt als Angriffspunkt für verschiedene Therapiestrategien (Abb.4) (Wen et al., 2013).

### 1.2.4 Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie

Wie bereits ausgeführt beruht die Apoptoseregulation auf der Wechselwirkung zwischen den pro- und antiapoptotischen Signalwegen. Dies wird auf besondere Weise, durch die Familie der Bcl-2 Proteine abgesichert (Eberle et al., 2007). Bcl-2 (engl.: B-cell lymphoma-2) wurde zum ersten Mal durch Tsujimoto im Jahr 1984 beschrieben (Tsujimoto et al., 1984). Danach wurden viele Proteine mit strukturell ähnlichen und konservierten Bereichen, den BH (engl.: Bcl-2 homology)-Domänen identifiziert und klassifiziert. Dabei kann die Familie der Bcl-2-Proteine in drei Gruppen eingeteilt werden:

- antiapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 (engl.: myeloid cell leukemia sequence 1) und
- proapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid und Bik.
- BH3-only Proteine

Bei den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen lassen sich proapoptotische Multidomänen-Proteine wie Bax (engl.: Bcl-2 associated X protein), Bak (engl.: Bcl-2 homologous antagonist killer), Bcl-xS (engl.: Bcl-2-like 1 short) und Bcl-xAK (engl.: Bcl-2-like 1 atypical killer) und die große Gruppe der BH-3-only-Proteine wie Bid, Nbk/Bik (engl.: Natural born killer/Bcl-2-interacting killer), Bad (engl.: Bcl-2 antagonist of cell death), Noxa und PUMA (engl.: p53 upregulated modulator of apoptosis) unterteilen (Hossini und Eberle, 2008; Kelly und Strasser, 2011). Die BH3-only-Proteine gelten als Schlüssel zur Apoptosekontrolle. Sie sind die direkten Gegenspieler der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Nach Apoptoseinduktion und der Aktivierung der BH3-only-Proteine binden diese an die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Dadurch neutralisieren sie deren Aktivität und sorgen für die Freisetzung von Bax und Bak.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Familie der Bcl-2-Proteine.** Dargestellt sind die Gruppen der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Die Gruppe der proapoptotischen Bcl-2-Proteine lässt sich in die Gruppe der Multidomänen-Proteine und die der BH-only-Proteine unterteilen. Zusätzlich sind die BH-Domänen (BH1-4) sowie die Transmembrandomäne (TM) gekennzeichnet (Eberle und Hossini, 2008).

Mit freundlicher Genehmigung von J. Eberle und A. Hossini



Die Bcl-2-Proteine befinden sich in direkter Nähe oder direkt an und in der äußeren Mitochondrienmembran. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine dienen der Stabilisierung der Mitochondrienmembran, die proapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bax, Bak) bilden Poren in der äußeren Mitochondrienmembran. Diese können die Membran permeabilisieren, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\psi_m$  führt (Kim et al., 2006).

### 1.2.5 Apoptoseregulation durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS)

Zu den Sauerstoffradikalen (ROS, engl.: reactive oxygen species) gehören unter anderem das Superoxid-Anion ( $O_2^\bullet$ ), das Hydroxyl-Radikal ( $OH^\bullet$ ) und Peroxide, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Heinen et al., 2007). ROS können über die NADP-Oxidase (engl.: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) generiert werden. Häufig ist aber die mitochondriale Elektronentransportkette, also die oxidative Phosphorylierung hauptverantwortlich für die Entstehung von ROS (Li et al., 2011; Maryanovich und Gross, 2012). Dabei sind moderate ROS-Spiegel auch an Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen beteiligt. Ferner wirkt ROS als sekundärer Botenstoff zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B oder p53. Ein erhöhter ROS-Spiegel löst oxidativen Stress aus, was zu Schäden an der Mitochondrienmembran, an Proteinen, der DNS und schließlich zur Apoptose oder Nekrose führt. Ein ausbalanciertes ROS-Aufkommen ist für die Zelle überlebenswichtig (Goossens et al., 1999; Li et al., 2011).

Proteine können direkt durch oxidativen Stress geschädigt werden, da es durch Oxidation zur Ausbildung von Disulfidbrücken und damit zur Bildung von Protein-Aggregaten kommt. Die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren verändert das Gefüge der Lipiddoppelschicht von Membranen und schädigt deren Zusammenhalt. Die Schäden, die durch ROS induziert werden, können sich auch auf genetische und epigenetische Prozesse beziehen. Es können Basen-Modifikationen stattfinden, die zu DNS-Strangbrüchen führen und Histon-Modifikationen, die zur DNS-Methylierung führen (Li et al., 2004; McCubrey und Franklin, 2006; Sadidi et al., 2009; Li et al., 2011; Maryanovich und Gross, 2012). Die Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumor-Zellmodellen nach Erzeugung von ROS durch verschiedene Substanzen wurde mehrfach beschrieben (Adler et al., 1999, Franke et al., 2010, Goossens et al., 1999, Kannappan et al., 2010, Lee et al., 2012; Kim et al., 2012), Li et al., 2004, Lee et al., 2012;).

Die Entstehung von ROS und dessen intrazelluläre Konzentration unterliegen der strikten Regulation durch verschiedene Antioxidantien, wie den Vitaminen C und E, der Gruppe der Carotinoide und Mineralstoffen wie Selen und Zink (Collins, 1999).



### 1.2.6 Caspasen

Caspasen gehören zu einer evolutionär konservierten Familie von Proteasen. Sie haben eine zentrale Funktion in apoptotischen und inflammatorischen Signalwegen (Lamkanfi et al., 2007). Man unterteilt die bisher identifizierten 14 Mitglieder der Caspasen-Familie in drei Gruppen. Die Gruppe der Zytokin-prozessierenden Enzyme und in die zwei Gruppen der Apoptose-relevanten Enzyme (Abb.6).

Caspase	1,4,5,11,12,13	2,8,9,10	3,6,7	14
Funktion	Entzündung, Reifung pro-inflammatorischer Zytokine	Apoptose	Apoptose	Keratinocytdifferenzierung
Gruppe		Initiator-caspasen	Effektor-caspasen	

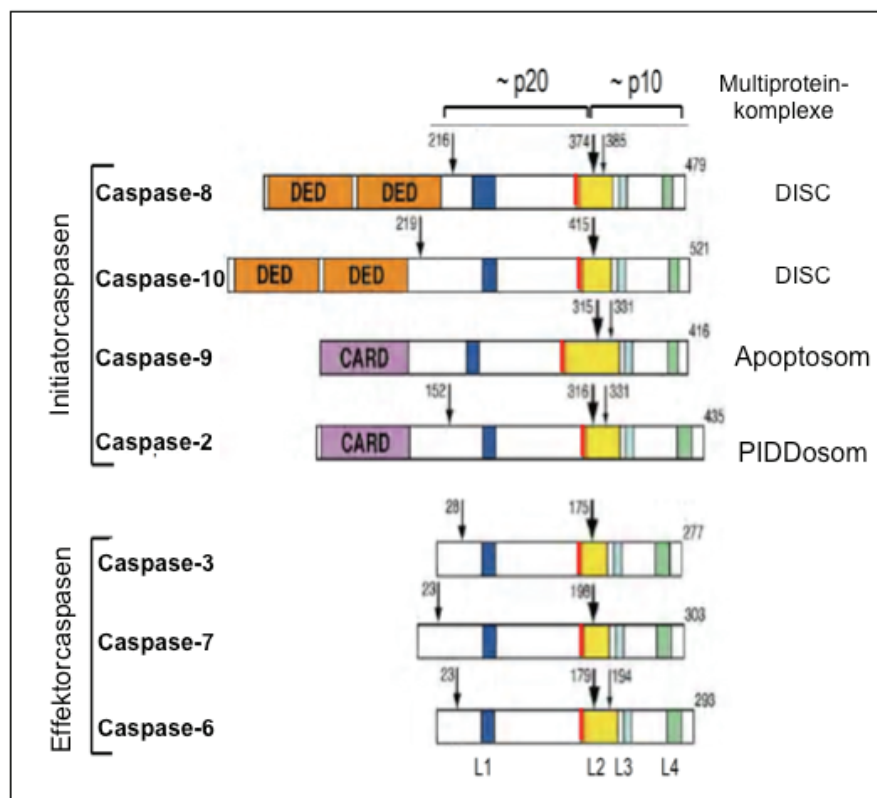
**Abbildung 6: Funktion von Caspasen in humanen Zellen** (Lamkanfi et al., 2007; Rupinder et al., 2007)

Dabei weisen alle Caspasen Gemeinsamkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Struktur und ihrer Substratspezifität auf. Sie werden als inaktive Proenzyme mit drei wichtigen Domänen exprimiert: einer N-terminalen Domäne, einer großen (etwa 20 kDa) und einer kleinen (etwa 10 kDa) Untereinheit. Zur Aktivierung werden sie an internen, für die Proteolyse zugängliche Stellen gespalten (Riedl und Shi, 2004; Wang et al., 2005). Eine Besonderheit stellt allerdings die Caspase-9-Aktivierung dar, da Procaspase-9 auch ohne proteolytische Prozessierung aktiviert werden kann. (Adams und Cory, 2002).

### 1.2.7 Rolle der Caspasen in der Apoptose

Caspasen sind für die Apoptoseregulation essentiell. Ihre Aktivierung erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen. Der Vorgang der Aktivierung setzt sich wie folgt zusammen: als erstes wird die Prodomäne abgetrennt und die katalytische Domäne in verschieden große Untereinheiten gespalten. Damit entstehen die aktiven Caspasen, die ein Heterotetramer bilden. (Rupinder et al., 2007; Pop und Salvesen, 2009). Für den Ablauf der Apoptose sind die Initiatorcaspasen (Caspasen-2, -8, -9, -10) und die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) von Bedeutung.

Die Initiatorcaspasen besitzen als charakteristische Struktur eine große Prodomäne, wie die DED (engl.: death effector domain), die CARD (engl.: caspase recruitment domain) oder die DID (engl.: death-inducing domain), denen eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Procaspasen zukommt. Die verschiedenen Domänen vermitteln die Interaktion zwischen Procaspasen und deren Adaptoren und ermöglichen damit die Autokatalyse (Rupinder et al., 2007). Diese erfolgt in großen Multiproteinkomplexen, wie dem Apoptosom, dem DISC und dem PIDDosom (Lamkanfi et al., 2007). Wenn zum Beispiel Todesliganden an den entsprechenden Todesrezeptoren binden, kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und damit zur Rekrutierung von Procaspase-8 und FADD. FADD bindet über seine Death Domains (DD) an den Rezeptor und über die Death Effector Domain (DED) an die Procaspase-8.



**Abbildung 7: Caspasenaufbau.** Die Position der ersten Spaltstelle, zwischen der großen (p20) und der kleinen (p10) Untereinheit, ist durch einen dicken Pfeil, die weiteren Schnittstellen durch weitere Pfeile gekennzeichnet. Die Prodomäne der Initiatorcaspasen enthält DED (death effector domain) oder CARD (caspase recruitment domain)-Domänen. Eingezeichnet sind die Loops (L1-4), die die Substrattasche bilden sowie in Rot (roter Strich) die katalytisch aktiven Cysteinreste (erweitert und verändert nach Shi, 2002, Quast et al., 2013).

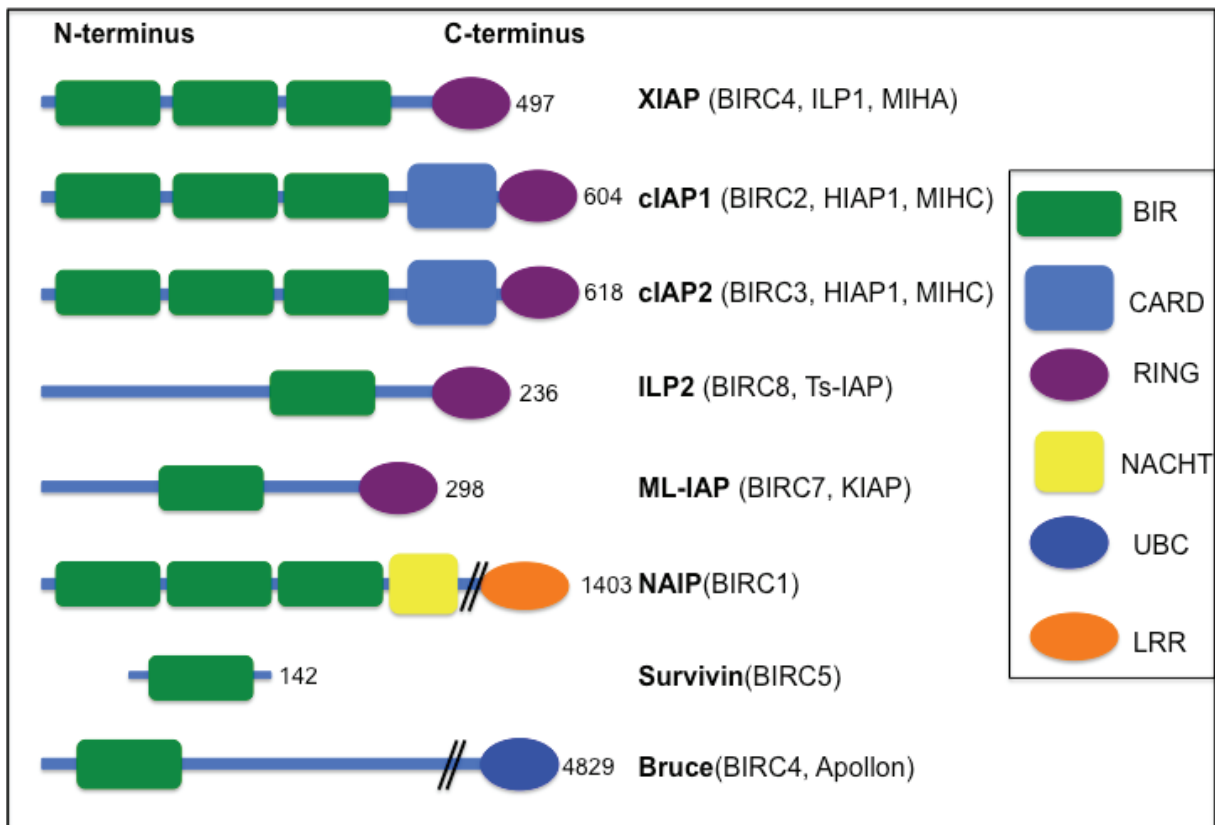
Dadurch kommt es zur autokatalytischen Aktivierung der Procaspase-8. Die Bindung an Cytochrom C führt zu einer Konformationsänderung von Apaf-1 (offene Konformation) und Bindung von ATP und Bindung von Procaspase-9. Daraus entsteht das Apoptosom, ein Multiproteinkomplex, das als Holoenzym agiert (Adams und Cory, 2002). Das PIDDosom entsteht, wenn die Procaspase-2 nach genotoxischem Stress durch p53 aktiviert wird und an die Adapterproteine PIDD (engl.: p53-induced protein with death domain) und RAIDD (engl.: RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) bindet (Tinel und Tschopp, 2004).

Effektorcaspasen sind die Caspasen-3, -6 und -7. Diese Caspasen unterscheiden sich von den Initiatorcaspasen strukturell und funktionell darin, dass sie als Dimere vorliegen und ihnen die lange Prodomäne fehlt. Damit fehlt ihnen die Fähigkeit zur Selbstaktivierung. Effektorcaspasen liegen als inaktive Dimere im Zytosol vor und müssen durch Initiatorcaspasen aktiviert werden (Kumar, 1999; Boatright und Salvesen, 2003). Nachdem sie gespalten wurden, kontrollieren die Effektorcaspasen hunderte von Todessubstraten, die für die Initiation der Apoptose verantwortlich sind (Fischer et al., 2003; Eberle und Hossini, 2008).

### 1.2.8 Kontrollmechanismen der Caspasen

Es bestehen verschiedene Kontrollmechanismen für die Caspasen, die die Inhibition und die Interaktion zwischen den Caspasen und ihren Aktivatoren beinhaltet. Zum einen können aktive Caspasen durch natürliche Caspase-Inhibitoren blockiert werden, zum anderen können sie auch permanent eliminiert werden. Dies erfolgt über einen Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Signalweg (Shi, 2002). Zu den natürlichen Inhibitoren von Caspasen zählen die Proteine p35 und p49 und Serpin CrmA (engl.: cytokine response-modifier A). CrmA inhibiert aktive Caspase-1 und -8, während p35 und p49 pan-Caspase-Inhibitoren sind und eher unspezifisch inhibieren (Nunez et al., 1998; Shi, 2002; Eckelman et al., 2006).

Die Familie der cIAPs (engl.: cellular inhibitor of apoptosis proteins) stellt spezifische Caspaseninhibitoren dar, deren charakteristisches Merkmal die BIR-Domänen (engl.: baculovirus IAP repeat) ist. Es handelt sich um Zink-bindende, antiapoptotische Strukturen (Riedl et al., 2001; Salvesen und Duckett, 2002; Scott et al., 2005). Bisher wurden acht IAPs identifiziert: XIAP, cIAP-1, cIAP-2, NIAP, ILP-2, Livin, Bruce und Survivin (Deveraux et al., 1999a; Deveraux et al., 1999b; Eckelman et al., 2006; Fulda, 2009a). XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) ist das am besten beschriebene IAP. XIAP ist in der Lage, die Initiatorcaspase-9 und die Effektorcaspase-3 und -7 zu blockieren.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung verschiedener Mitglieder der IAP-Proteinfamilie.** (verändert nach Scott et al., 2005; Bratton und Salvesen, 2010) Zusätzlich zu der BIR-Domäne haben die meisten IAPs auch noch andere funktionelle Domänen. Die RING-Domäne, eine E3 Ligase, die entsprechende Targets zur Degradierung zum Ubiquitin-Proteasom-System leitet, ist in vielen IAPs vorhanden. Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARDs) können Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, obwohl die Bindungspartner der IAP-CARDs bis jetzt noch nicht identifiziert sind. Die UBC-Domäne ähnelt der Ubiquitin-konjugierenden Domäne in anderen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen. Die NACHT-Domäne ist nur in dem neuronalen IAP (NAIP) zu finden und die Leucinreichen Wiederholungen (LRR) ähneln denen in den Toll-like Rezeptoren und dienen als Pathogensensoren (Eckelman et al., 2006).

Die IAPs werden mit der Regulation der Caspasen-abhängigen Apoptose in Verbindung gebracht, sind aber auch in verschiedenen anderen Signalwegen involviert, wie der NF-κB Aktivierung (Galban und Duckett, 2010), der Metastasierung, der MAPK- (engl.: Mitogen-activated protein kinase) Signalgebung und der Mitose (Salvesen und Duckett, 2002; Dogan et al., 2008; Mehrotra et al., 2010). Die Expression von verschiedenen IAPs in unterschiedlichen Tumoren mit Chemotherapieresistenz ist oft mit Progression und schlechter Prognose verbunden (LaCasse et al., 2008). Reguliert werden die IAPs durch verschiedene natürliche Antagonisten, von denen allerdings nur für SMAC der Mechanismus beschrieben ist.

SMAC ist ein mitochondriales Protein, das im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Es wird über seine Lokalisation innerhalb der Zelle reguliert. SMAC wirkt proapoptotisch, da es die Bindung der IAPs an Caspasen und somit ihre Inhibition blockiert. Diese Erkenntnis führte zu der Entwicklung der SMAC-Mimetika, synthetischen Peptiden, die den physiologischen IAP-Inhibitor SMAC/DIABLO nachahmen. Der therapeutische Wert wird in verschiedenen klinischen Studien dieser Peptide derzeit untersucht (Jost et al., 2009; Gyrd-Hansen und Meier, 2010).

### 1.3 TRAIL und seine Rezeptoren

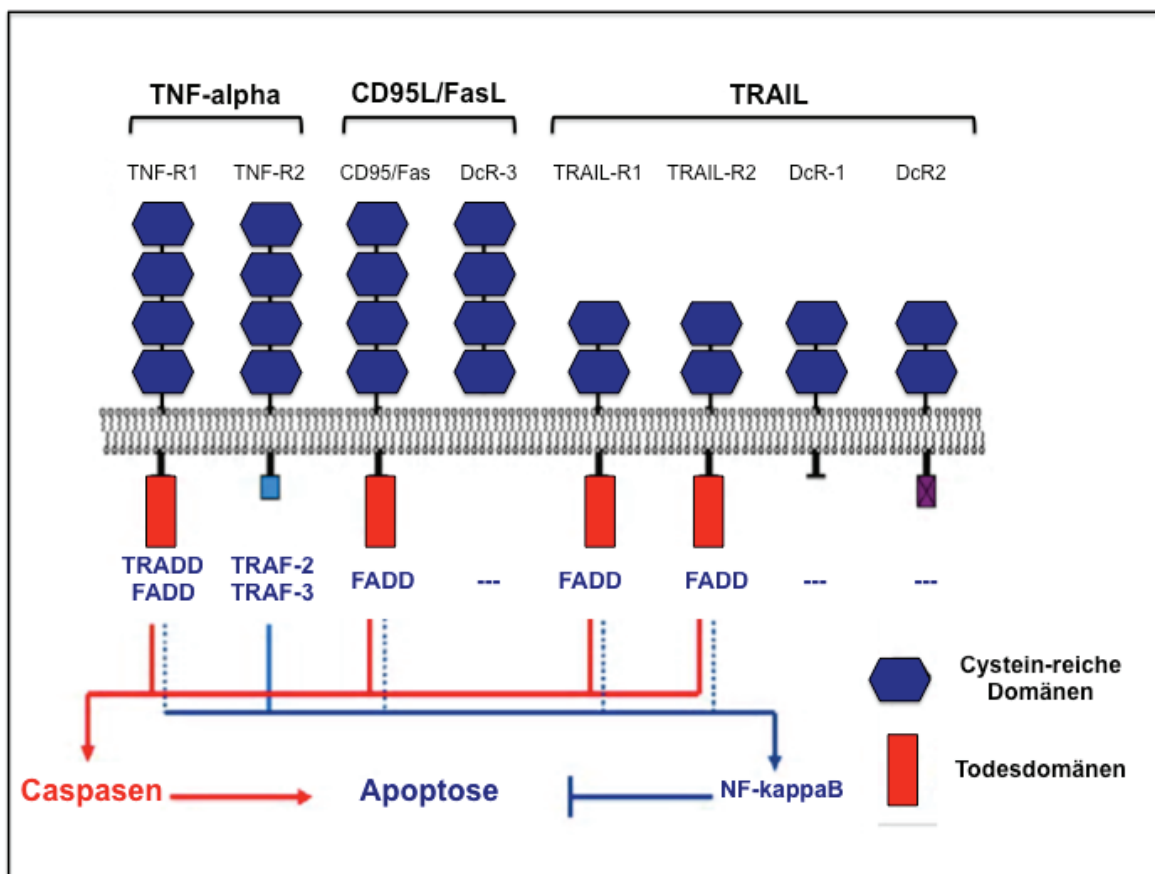
TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) gehört zur Familie der TNF- (engl.: tumor necrosis factor) Zytokin-Superfamilie. Im Jahr 1995 wurde TRAIL durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen auf Grund der Sequenzhomologie zu TNF-alpha und CD95/FAS-Ligand entdeckt (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996).

TRAIL ist ein Typ-II Transmembranprotein, d.h. der C-Terminus liegt extrazellulär und der N-Terminus intrazellulär. Der C-Terminus von TRAIL ist der Teil, der die Sequenzhomologien mit anderen TNF-Familienmitgliedern aufweist. Diese Domäne kann proteolytisch abgespalten werden und als löslicher Ligand vorliegen (Abe et al., 2000; Almasan und Ashkenazi, 2003). Bei TRAIL handelt es sich um ein Homotrimer, das an drei Rezeptormoleküle bindet. Ein Zinkatom, welches von Cysteinresten am trimeren Liganden gebunden wird, ist essentiell für die Stabilität und die optimale biologische Aktivität (Almasan und Ashkenazi, 2003; Wang und El Deiry, 2003).

Das Besondere an TRAIL ist, dass es anders als die anderen TNF-Familienmitglieder in einer Vielzahl von Geweben konstitutiv exprimiert ist. Das weist darauf hin, dass TRAIL *in vivo* nicht zytotoxisch ist (Wang und El Deiry, 2003; Di Pietro und Zauli, 2004). TRAIL-Knockout-Mäuse entwickeln sich vollkommen normal, sind fertil und weisen keine hämatologischen Defekte auf. Die Sensitivität dieser Tiere für immuninflammatorische Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis ist allerdings stark erhöht. TRAIL hat also auf die Entwicklung keinen, aber auf die Regulation des Immunsystems einen entscheidenden Einfluss. Zellen des Immunsystems exprimieren TRAIL vermehrt, wie zum Beispiel Makrophagen, NK-Zellen, dendritische Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen oder Monozyten. Die Immunüberwachung und die Tumorsuppression sind die Hauptaufgaben von TRAIL (Almasan und Ashkenazi, 2003; Di Pietro und Zauli, 2004; Dimberg et al., 2012b; Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Dabei spielen Zytokine wie TRAIL auch eine wichtige Rolle

in der Apoptose, beim Zellwachstum, in der Differenzierung und in verschiedenen anderen Signalwegen (Srivastava, 2001; Di Pietro und Zauli, 2004).

TRAIL bindet an zwei agonistische Todesrezeptoren DR4 (Death Receptor 4), auch TRAIL-Rezeptor-1 genannt, und DR5 (TRAIL-R2). Beide Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer extrazellulären Domäne und einer intrazellulären Todesdomäne. Allerdings kann TRAIL auch an zwei antagonistische Decoy-Rezeptoren DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4) und an den löslichen Rezeptor OPG (Osteoprotegrin) binden, welches ebenfalls ein Decoy-Rezeptor ist (Johnstone et al., 2008; Mahalingam et al., 2009). Der DcR1 ist ein reines Oberflächenprotein ohne zytosolische Domäne, wohingegen DcR2 über eine verkürzte, funktionslose zyttoplasmatische Todesdomäne verfügt. Beide TRAIL-Decoy-Rezeptoren sind daher nicht in der Lage ein Todessignal weiterzuleiten. Sie konkurrieren allerdings direkt mit DR4 und DR5 um die TRAIL-Bindung (Almasan und Ashkenazi, 2003). Die agonistischen Rezeptoren DR4 und DR5 und scheinen ubiquitär exprimiert zu sein (Abb. 9).



**Abbildung 9: Todesliganden und ihre Rezeptoren.** Schematische Darstellung der bedeutsamsten Todesliganden und der entsprechenden Todesrezeptoren sowie nachgeschalteter Signalwege (verändert nach Eberle et al., 2007).

Mit freundlicher Genehmigung von J. Eberle

### 1.3.1 Aktivierung alternativer Signalwege durch TRAIL

Eine Behandlung mit TRAIL kann auf Zellen auch pro-proliferativ wirken und verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Dazu gehören der NF-kappa B (engl.: nuclear factor kappa B)-Signalweg, der MAPK (engl.: mitogen-activated protein kinase)-Signalweg, der JNK (engl.: c-Jun N-terminal kinase)-Signalweg und der PI3K (engl.: Phosphatidylinositol-3-kinase)-Akt/PKB (Proteinkikinase B)-Signalweg. Die Bindung von TRAIL an DR4 oder DR5 führt unter anderem zur Aktivierung von NF-κB und der MAPKs durch TRADD (engl.: TNFR1-associated death domain protein). Eine erhöhte NF-κB-Aktivierung konnte mit der TRAIL-Resistenz von leukämischen und Neuroblastom-Zelllinien in Verbindung gebracht werden. Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (engl.: extracellular signal-regulated kinase 1/2) durch TRAIL kann zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation in verschiedenen Tumorzelllinien und über die Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> zur Apoptoseresistenz führen.

Der PI3K-Akt-Signalweg ist wichtig bei der Entstehung von Neoplasien, da er die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen unterstützt. Zellen mit PI3K-Mutationen sind resistent gegen die TRAIL-induzierte Apoptose, was die Bedeutung des PI3K-Akt/PKB-Signalweges für die Sensitivierung von Tumorzellen zeigt. TRAIL reguliert neben Überlebens-Signalwegen (engl.: survival pathways), physiologische Prozesse, wie die Hämatopoese und die T-Zell-Aktivierung.

Auch bei weiteren pathologischen Zuständen wie Autoimmunerkrankungen, Diabetes und Entzündungsreaktionen (Di Pietro und Zauli, 2004; Falschlehner et al., 2007; Johnstone et al., 2008; Dimberg et al., 2012b) spielt es eine Rolle. Das bedeutet, dass die Aktivierung eines oder mehrerer Signaltransduktionswege über das proapoptotische Signal dominieren kann und damit dramatische Auswirkungen auf die physiologischen und therapeutischen Eigenschaften von TRAIL haben kann.

### 1.3.2 Resistenzentwicklung gegenüber TRAIL

Die Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen TRAIL ist das größte Hindernis in der Entwicklung einer therapeutischen Nutzung von TRAIL (Wang und El Deiry, 2003). Allerdings hatten die Analysen der molekularen Mechanismen der TRAIL-Resistenz auch die Identifizierung einiger charakteristischer Defekte im Apoptosesignalweg von Tumorzellen zur Folge. Es konnte gezeigt werden, dass Resistenzmechanismen sich sowohl an der Membran als auch intrazellulär entwickeln können (Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Eine Resistenz, die auf Ebene der Todesrezeptoren entsteht, wird durch eine höhere



Präsenz von Decoy-Rezeptoren, die mit den funktionellen Todesrezeptoren konkurrieren, vermittelt. Ein Verlust der Expression von DR4 und/oder DR5 an der Zelloberfläche sowie Mutationen an den Todesrezeptoren kann ebenfalls zur Resistenzentstehung führen. DR4-Mutationen konnten in bis zu 44 % der Zellen von Ovarial-, Brust-, Blasen- und Lungentumoren nachgewiesen werden. Eine TRAIL-Resistenz kann auch durch die Verteilung der Todesrezeptoren in der Membran entstehen (Zhang und Fang, 2005; Maksimovic-Ivanic et al., 2012; Dimberg et al., 2012b). Darüber hinaus ist die funktionelle Expression von DR4 und DR5 mit der TRAIL-Resistenz in Lungen-, Kolon- und Brustkrebszellen in Verbindung gebracht worden (Kim et al., 2000; Jin et al., 2004).

Resistenzmechanismen, die sich auf der intrazellulären Ebene abspielen, sind zum Beispiel eine verminderte Expression der Initiatorcaspasen-8 und -10, wie es in Melanom-, Kolon- und Neuroblastomzelllinien nachgewiesen werden konnte (Grotzer et al., 2000; Jin et al., 2004; Kurbanov et al., 2007). Auch die Überexpression von c-FLIP, IAPs wie XIAP oder Survivin kann zur Entstehung einer TRAIL-Resistenz führen (Tanaka et al., 2000; Mahalingam et al., 2009; Dimberg et al., 2012a; Maksimovic-Ivanic et al., 2012). In Tumorzellen vom Typ-II muss man auch zytoprotektive Moleküle des mitochondrialen Signalweges mit zu den TRAIL-Resistenz-begünstigenden Substanzen zählen. Dazu gehören auch antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 in Neuroblastom- und Brustkrebszelllinien oder Mcl-1 in Kolon- und hepatozellulären Karzinomen (Mahalingam et al., 2009; Gillissen et al., 2010).

Melanomzelllinien zeigen sich grundsätzlich sensitiv für die TRAIL-induzierte Apoptose. Allerdings können sie eine vorhandene oder induzierbare Resistenz, die durch eine kontinuierliche Behandlung mit TRAIL bewirkt wurde, aufweisen (Zhang et al., 2006; Kurbanov et al., 2007). Eine induzierbare TRAIL-Resistenz in DR4-positiven Melanomzellen konnte als nur vorübergehend charakterisiert werden. TRAIL-selektierte Melanomzellen zeigen eine Herabregulation von DR4 und/oder DR5 und eine Herabregulation der Initiatorcaspasen und des proapoptischen Proteins Bid (Kurbanov et al., 2007).

### **1.3.3 Therapeutischer Einsatz von TRAIL**

Todesliganden haben *in vitro* und *in vivo* ihr Potential für die Tumorthherapie gezeigt. Im Gegensatz zu vielen anderen Chemotherapeutika induzieren sie Apoptose in Tumorzellen unabhängig von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und p53. Da diese in mehr als der Hälfte der humanen Tumorentitäten inaktiviert sind, können Todesliganden interessant für die Therapie von Tumoren sein, die eine Resistenz gegenüber konventionelle Chemo- und Radiotherapien aufweisen (Dimberg et al., 2012b; Walczak et al., 2000; Wang und El Deiry, 2003).



Die klinische Anwendung von verschiedenen Todesliganden zeigte allerdings eine hohe Toxizität gegen normale Gewebezellen und hatte den Tod von Versuchstieren im experimentellen Modell zur Folge oder resultierte in starken Entzündungsreaktionen, septischem Schock oder Leberversagen (Ashkenazi 2002, Kelley und Ashkenazi, 2004)

TRAIL dagegen induziert Apoptose in einer Vielzahl von Krebszellen und hat nur eine geringe Toxizität gegenüber normalen Zellen. Damit unterscheidet TRAIL sich von allen anderen Liganden der TNF-Superfamilie und macht es zu einem interessanten Kandidaten für die Tumortherapie (Maksimovic-Ivanic et al., 2012).

Verschiedenste Krebszelllinien wie zum Beispiel aus Kolon-, Lungen-, Brust-, Prostata-, Pankreas-, Nieren-, Schilddrüsen-Tumore oder Lymphome, Leukämien und multiplen Myelomen weisen eine hohe Sensitivität gegenüber dem proapoptotischen Effekt von TRAIL auf (Ashkenazi, 2002; Di Pietro und Zauli, 2004). Tiermodelle mit humanen Xenotransplantaten für Kolonkarzinome (LeBlanc und Ashkenazi, 2003), Gliome (Fulda et al., 2002), multiple Myelome und Lungenkrebs (Mitsiades et al., 2001), die mit TRAIL als Mono- oder Kombinationstherapie behandelt wurden, zeigten beachtenswerte Antitumoreffekte (Di Pietro und Zauli, 2004; Cretney et al., 2007). In klinische Studien an soliden Tumoren und Lymphomen zeigte die Monotherapie mit TRAIL und TRAIL-Rezeptor-Agonisten geringe Toxizität am Patienten aber auch eine beschränkte Effektivität (Herbst et al., 2010a; Herbst et al., 2010b; Younes et al., 2010).

Daher scheint die Kombination von TRAIL mit anderen Chemotherapeutika, Kinaseinhibitoren und biologischen Wirkstoffen zwingend notwendig. Die TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzellen, konnte durch die Kombinationsbehandlung mit genotoxischen Agenzien wie Doxorubicin, Cisplatin und Etoposid (Vaculova et al., 2010; Xu et al., 2011), mit UVB-Bestrahlung (Hornle et al., 2010) oder mit Kinaseinhibitoren (Berger et al., 2011; Berger et al., 2013, Quast et al. 2013, Quast et al., 2014) synergistisch verstärkt werden. Dieser synergistische Effekt wird durch die Hochregulierung der TRAIL-Todesrezeptoren, Modulation der Mitglieder der Bcl-2-Familie und die Inhibition der Mitglieder der IAP-Familie vermittelt.

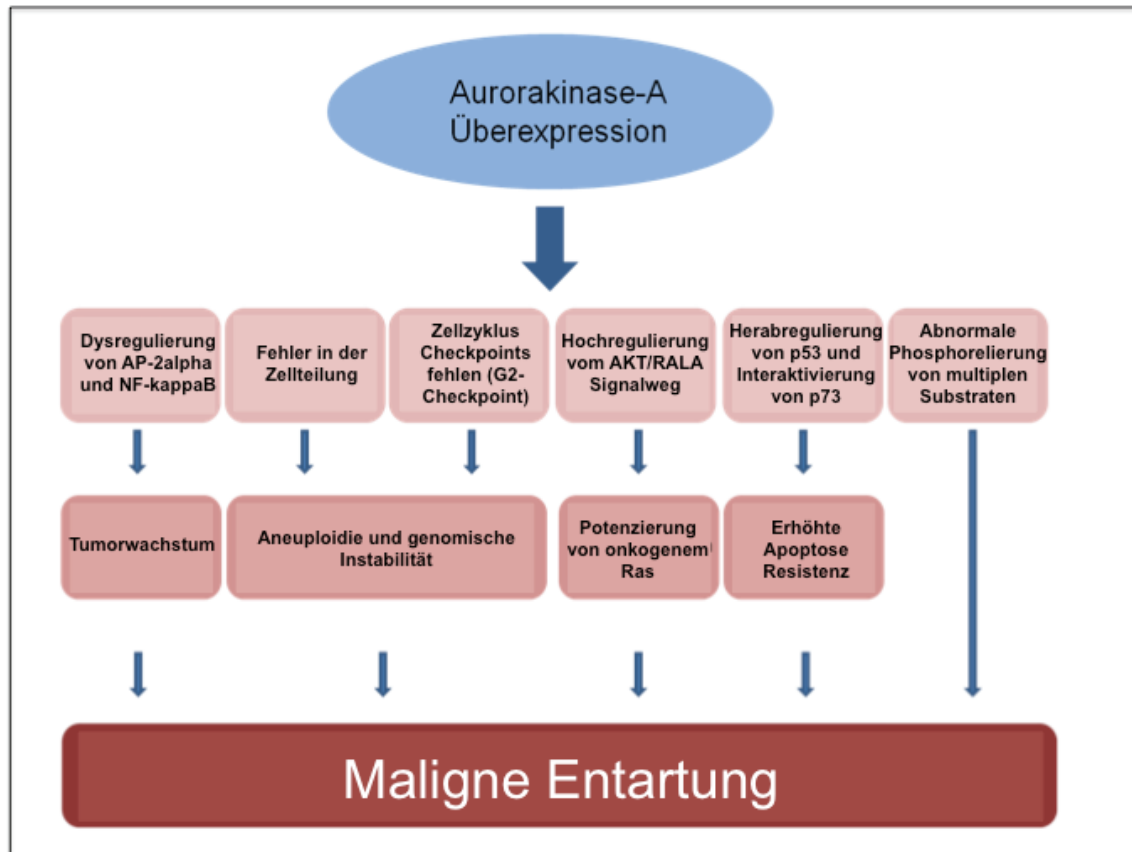
Viele Tumore schützen sich durch eine hohe Expression von Decoy-Rezeptoren vor TRAIL-induzierter Apoptose und so könnte sich die Behandlung mit spezifischen, agonistischen Todesrezeptor-Antikörpern als effizient erweisen. Gegenwärtig gibt es einige Studien, die den therapeutischen Nutzen von spezifischen agonistischen Todesrezeptor-Antikörpern als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika und Kinaseinhibitoren in verschiedenen Krebsentitäten untersuchen (Johnstone et al., 2008 und Datenbank der Klinischen Studien: [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov)).

## 1.4 Aurorakinasen

Die Aurorakinasen gehören zur Familie der evolutionär hoch konservierten Serin/Threoninkinasen und wurden 1995 in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Ihre Aufgabe besteht in der Regulation des Spindelpols während der Zellteilung (Glover et al., 1995). Es gibt drei Aurorakinase-Isoformen, Aurorakinase A, B und C, die alle am Kern lokalisiert sind und große Sequenzhomologien in ihrer katalytischen Domäne aufweisen. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Funktion (Carmena und Earnshaw, 2003). Aurorakinase A ist die am besten untersuchte Aurorakinase und ist in die Bildung von Mikrotubuli und der Spindelpole während der Auftrennung der homologen Chromosomen eingebunden. Diese Kinase befindet sich während der Interphase des Zellzyklus am Zentrosom und während der Mitose an den Spindelpolen. Ursprünglich wurde das Aurorakinase-Gen BTAK (breast tumor activated kinase) genannt, da es in Mammakarzinomzellen überexprimiert ist (Sen et al., 1997).

Aurorakinase B befindet sich an den Mikrotubuli, besonders an den Kinetochor-Mikrotubuli. Aurorakinase C ist ein sogenanntes *chromosomales Transportprotein*, das wahrscheinlich während der Mitose die Mikrotubuli organisiert. Aurorakinasen sind nicht nur im Mammakarzinom, sondern bei einer Reihe von anderen Tumorerkrankungen überexprimiert, wie zum Beispiel dem Kolonkarzinom (Katayama et al., 1999), dem Schilddrüsen-Karzinom (Sorrentino et al., 2004), dem Gliom (Reichardt et al., 2003) und den non-Hodgkin Lymphomen (Hummel et al., 2015). Sowohl eine zu niedrige als auch eine zu hohe Aktivität der Aurorakinasen wird mit genetischer Instabilität in Verbindung gebracht. Eine Fehlfunktion auf Ebene der Aurorakinasen kann Aneuploidie, Zellzyklus-Arrest und Apoptose hervorrufen (Zhang et al., 2004).

Zahlreiche Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Dysregulation von Aurorakinase A und einer schlechten histologischen Differenzierung von Tumoren, sowie höheren Tumorstadien und damit einhergehend ungünstigen Prognosen. Darüber hinaus legt die Verbindung zwischen Aurorakinase-A-Überexpression und Aneuploidie nahe, dass eine Überexpression von Aurorakinase-A für die Entstehung genetischer Alterationen verantwortlich ist und damit für die Karzinogenese (Abb 10).



**Abbildung 10: Aurorakinase-Überexpression und ihre Folgen** Die Überexpression von Aurorakinase-A induziert eine Vielzahl von Zellwachstums- und Proliferationsdefekten und fördert so die Entstehung von Krebs. (Schematische Darstellung verändert nach Nikonova et al., 2013)

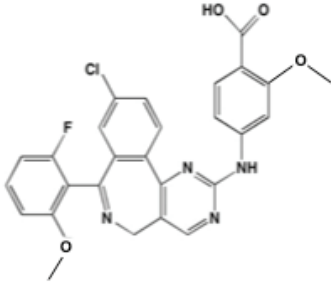
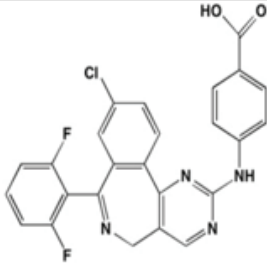
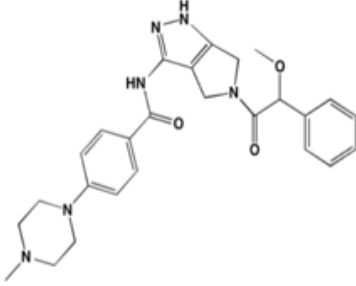
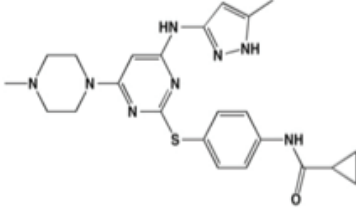
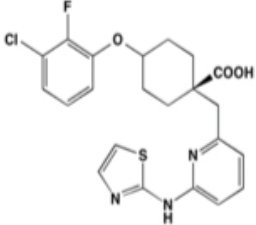
In genomischen Analysen von humanen Melanomzellen wurde eine Überexpression von Aurorakinase A nachgewiesen (Pirker et al., 2010). Diese Entdeckung machten die Aurorakinasen auch im Melanom zu einem potentiellen therapeutischen Angriffspunkt. Während zu Beginn nur die Aurorakinase A als relevante therapeutische Zielstruktur angesehen wurde, zeigten spätere Untersuchungen auch die Bedeutung von Aurorakinase B für die Entstehung von Tumoren. Die gezielte Inhibition der Aurorakinaseaktivität führte in verschiedenen Studien zum Zellzyklusarrest in der G2/M- Phase und zur Induktion von Apoptose.

### 1.4.1 Aurorakinase Inhibitoren

Die pathologische Funktion der Aurorakinase A-Überexpression ist in den letzten Jahren genauer erforscht worden, sodass das Protein als Zielstruktur von immer größerem Interesse wurde. In den vergangenen Jahren wurden daher einige neue „Small-molecule“-Inhibitoren für die Gruppe der Aurorakinasen entwickelt, von denen sich derzeit mehrere in der präklinischen oder klinischen Prüfung befinden. Die Blockierung der Funktion durch diese Inhibitoren von Aurorakinase A und B in Melanomzellen zeigte eine antiproliferative Wirkung, führte zu Apoptoseinduktion und zum Zellzyklusarrest (Wang et al., 2010). Erst kürzlich konnte in Mausmodellen mit Melanom-Xenotransplantaten gezeigt werden, dass die Inhibition von Aurorakinase die Tumorpheriferation blockieren konnte (Lui et al., 2013). Nach Behandlungsende zeigten 50 % der Melanom-Xenotransplantate keine Progression für 12 Monate.

Ein bedeutender Vertreter ist der Inhibitor Alisertib (MLN8237). Dieser Inhibitor ist der erste oral verfügbare und hoch selektive Aurorakinase-A-Inhibitor und fand bereits in verschiedenen Studien Verwendung (Abb. 11). Die Ergebnisse waren dabei positiv, sodass sich der Inhibitor mittlerweile in Studien der Phase III befindet. Beispielsweise konnte in einer Phase II-Studie in B- und T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen eine Ansprechrate von 27 % gezeigt werden (Friedberg et al. 2013). Der in dieser Arbeit verwendete Aurorakinase-A-Inhibitor Alisertib (MLN 8237) ist ein hochspezifischer und potenter Vertreter seiner Gruppe ( $IC_{50}=1$  nM), der von Millenium Pharmaceuticals entwickelt wurde (Sells et al., 2008). Momentan befindet sich der Inhibitor in Studien der Phase II und aktuell in einer Studie der Phase III beim T-Zell-Lymphom. Bisher konnte eine antiproliferative Wirkung des Inhibitors in verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen werden (z.B. HCT116, LY-3, PC3, SK-OV-3) (Sells et al., 2008). Die Spezifität zeigte sich durch Inhibition der Autophosphorylierung nach Behandlung mit 0,5  $\mu$ M in Myelom-Zellen. G2-Arrest, gefolgt von Apoptose, Spaltung von PARP, Caspase-9 und -3 und Zelltod durch Seneszenz bei längerer Exposition, wurden in Multiplen-Myelom-Zellen beschrieben. Im Mausmodell konnte für das Multiple Myelom eine Anti-Tumor-Wachstum-Wirkung in vivo nachgewiesen werden. Die Überlebensrate wurde signifikant erhöht und Tumorzellvolumina deutlich verringert (Gorgun et al., 2011). In verschiedenen anderen Tumorentitäten wurde dies ebenfalls bestätigt (Maris et al., 2010).

Studien zur Patientenverträglichkeit und Pharmakokinetik zeigten, dass eine Dosierung von 2x50 mg/Tag über 7 Tage für Patienten tolerabel waren. Unter dieser Dosierung traten als Nebenwirkungen vorwiegend eine febrile Neutropenie und eine Thrombozytopenie auf. Eine Akkumulation von mitotischen Zellen in Tumorbiopsien und dosisabhängige Plasmaspiegel des Inhibitors konnte nachgewiesen werden (Dees et al., 2012).

Inhibitor	Spezifität	Struktur	Klinische Studien
Alisertib (MLN8237)	Aurorakinase-A Inhibitor: IC50 von 1.2 nM;  >200-fach höhere Selektivität für Aurora A als für Aurora B.		Phase I: 33 Phase II: 20  Phase III: 1 (T-Zell Lymphom)
MLN8054	Aurorakinase-A Inhibitor: IC50 von 4 nM;  > 40-fach höhere Selektivität für Aurora A als für Aurora B		Phase I: 2 Phase II: 0 Phase III: 0
Danusertib (PHA- 739358)	Inhibitor für Aurorakinase- A/B/C mit IC50 von 13 nM/79 nM/ 61 nM,		Phase I: 0 Phase II: 3 Phase III: 0
Tozasertib (VX-680; MK- 0457)	Pan-Aurorakinase Inhibitor;  meist gegen Aurora A mit IC50 von 0.6 nM		Phase I: 4 Phase II: 2 Phase III: 0
MK-5108 (VX- 689)	Aurorakinase-A Inhibitor: IC50 von 0.064 nM; 220- und 190-fach höhere Selektivität für Aurora A als für Aurora B/C		Phase I: 1 Phase II: 0 Phase III: 0

**Abbildung 11: Aurorakinase-Inhibitoren** Die Tabelle zeigt eine Auswahl aktueller Aurorakinase-Inhibitoren, deren Spezifität und Struktur, sowie in wievielen Studien verschiedener Phasen sich die Inhibitoren befinden ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov))

## 2. Fragestellung

---

Das maligne Melanom gehört zu den aggressivsten und therapieresistentesten Tumorentitäten und ist besonders im metastasierten Stadium mit infauster Prognose verbunden. Die hohe Mortalität macht es zu einem wichtigen Modelltumor. Derzeit gibt es leider immer noch wenige wirksame Therapiemöglichkeiten. Ein verbessertes Verständnis der Apoptoseregulation und der Mechanismen der Resistenzentwicklung ist daher von hoher medizinischer Bedeutung für die Entwicklung von innovativen Therapieansätzen.

Neben den zugelassenen Therapeutika wie Vemurafenib aus der Gruppe der BRAF-Inhibitoren, Ipilimumab, ein anti-CTLA-4-Antikörper und dem PD-1-Antikörper, sind TRAIL und agonistische Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren vielversprechende therapeutische Ansätze. TRAIL entfaltet seinen apoptotischen Effekt selektiv an einer Vielzahl von Krebszellen, während gesunde Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Der limitierende Faktor für einen Einsatz von TRAIL in der Melanomtherapie ist die relativ schnelle Entwicklung von Resistenzen gegenüber TRAIL.

In dieser Arbeit war es das Ziel, in einer repräsentativen Auswahl von humanen Melanomzelllinien zu untersuchen, ob mittels Inhibition von Aurorakinase A die TRAIL-Resistenz überwunden werden kann und die Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden können. Neben der Überprüfung einer möglichen Zytotoxizität des Kinaseinhibitors Alisertib auf die untersuchten Melanomzellen wurde dessen Wirkung auf die Apoptoseinduktion, der Zellviabilität und die Zellproliferation sowie den Zellzyklus untersucht. Hierbei wurde der Kinaseinhibitor alleine und in Kombination mit TRAIL eingesetzt. Der Wirkmechanismus wurde auf Ebene der Caspasenkaskade und des mitochondrialen Apoptosesignalwegs untersucht. Darüber hinaus wurden die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) auf die Apoptose und die Involvierung verschiedener Bcl-2-Proteine und schließlich der Einfluss auf p53/p21 untersucht.

Diese Arbeit soll zum besseren Verständnis der TRAIL-Resistenz beim malignen Melanom beitragen. Die Überwindung dieser Resistenz mittels Aurora-Kinase-A-Inhibitoren war und ist von zentralem Interesse, um so mögliche neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren und zu definieren. Die Grundlage zur möglichen therapeutischen Nutzung von TRAIL in Kombination mit Kinaseinhibitoren wurde bereits durch andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe geschaffen (Quast et al. 2014) und soll durch diese Arbeit erweitert werden. Die in dieser Dissertation gezeigten Ergebnisse sind nicht Teil anderer Arbeiten.

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1 Verwendete Zelllinien und ihre Kultivierung

#### 3.1.1 Zelllinien

##### Humane maligne Melanom-Zelllinien

Es wurden folgende maligne Melanom-Zelllinien verwendet: A-375 (Giard et al., 1973) und Mel-HO (Holzmann et al., 1988), die aus Primärtumoren gewonnen wurden, sowie MeWo (Kerbel et al., 1984) und Mel-2a (Bruggen et al., 1981), die aus Metastasen gewonnen wurden.

##### TRAIL-resistente Melanomzelllinien

TRAIL-resistente Melanomzelllinien wurden durch kontinuierliche Selektion parentaler A-375 Zellen generiert. Dafür wurden parentale A-375 Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und mit 100 ng/ml TRAIL für 8 - 10 Wochen selektiert. Die so selektierten Zellen wurden weiter passagiert und kontinuierlich in Wachstumsmedium mit 5 ng/ml TRAIL gehalten (Kurbanov et al., 2007).

#### 3.1.2 Zellkultur – Kultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium wurde bei allen Zelllinien DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 32430, Gibco) mit 4,5 g/l Glucose, 25 mM HEPES, Glutamax, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Es wurde zur Kultivierung der TRAIL-selektierten Zellen zusätzlich mit 5 ng/ml TRAIL versetzt um die bestehende Resistenz zu bewahren.

Alle verwendeten Zelllinien wachsen adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen. Das Zellmedium wurde etwa jeden dritten Tag gewechselt. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit sterilem PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gespült wurden. Damit wurden tote Zellen und Stoffwechselprodukte entfernt.

Zur Zellpassage wurden diese ebenfalls mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden wurden sie mit Medium vom Boden der Kulturflasche abgespült und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das FCS im Medium stoppt die Proteolyse durch das Trypsin. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 283 g zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und danach mit entsprechender Zellzahl für die Versuche, oder zur weiteren Kultivierung ausgesät.

### **3.1.3 Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen, mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und anschließend in 10 % FCS-haltigem Medium überführt und 5 min bei 283 g zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in Medium mit 50 % FCS und 20 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das DMSO in der Lösung verhindert die Bildung von Eiskristallen in den Zellen beim Einfriervorgang. Anschließend wurden die Röhrchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Röhrchen in Stickstoff-Tanks überführt und bei  $-140^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.2 Verwendete Reagenzien**

Für die Strategie der TRAIL-Sensitivierung wurde der Aurorakinase A Inhibitor Alisertib MLN 8237 von Sellechem eingesetzt.

### **3.3 Verwendete Antikörper**

Die Apoptose wurde mit KillerTRAIL (soluble, human, rekombinant, ALX-201-073, Alexis, Gruenberg, 20 ng/ml) induziert. Zur Lösung des KillerTRAIL wurde ein entsprechender KillerTRAIL Lagerungspuffer (ALX-505-005, Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) verwendet.

### **3.4 Zellbiologische Methoden**

#### **3.4.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wurde zur multiparametrischen Analyse einzelner Zellen angewendet. Dabei können Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Granularität oder Anfärbung analysiert werden. Die Zellen werden mit Überdruck durch eine Messkammer gedrückt. Beim Eintritt in die Kammer werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, damit sich mögliche Zellaggregate lösen. Die Zellen werden an einem Argonlaser (Wellenlänge  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) vorbeigeführt. Aus der Vorwärtsstreuung (FSC) des Lasers ergibt sich die Größe der Zelle und aus der Seitwärtsstreuung (SSC), die Granularität der Zelle. Über drei weitere Messkanäle (FL1:  $\lambda = 530 \text{ nm}$ , FL2:  $\lambda = 585 \text{ nm}$ , FL3:  $\lambda = 650 \text{ nm}$ ) kann gleichzeitig zu den anderen beiden Parametern Licht verschiedener Wellenlängen detektiert werden, zur Analyse von fluoreszenzmarkierten Antikörpern.



Dieses Verfahren kann Strukturen auf der Zelloberfläche oder die Permeabilisierung der Zellen auch im Zellinneren nachweisen. Die in dieser Arbeit dargestellten durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Bioscience) durchgeführt. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Bioscience) oder mittels WinMDI Version 2.9 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

### **3.4.2 Nachweismethoden - Apoptose**

Die Fragmentierung von DNS, ist ein charakteristisches Merkmal der Apoptose. Verschiedene Methoden zum Nachweis von DNS Fragmentierung stehen momentan zur Verfügung. Ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zum direkten Nachweis von freien DNS-Enden kann verwendet werden, aber auch der Nicoletti-Assay (Riccardi und Nicoletti, 2006), bei dem apoptotische Sub-G1-Zellpopulationen mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Propidiumjodid-Färbung ermittelt werden. Die Quantifizierung des Anteils an apoptotischen, hypodiploiden Zellen (Sub-G1-Zellfraktion) in Prozent erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wird der DNA-Gehalt von Zellen mittels PI-Färbung nachgewiesen. Dafür wurden die Zellen zunächst trypsiniert und mittels Zentrifugation für 5 min bei 241 g pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen und in einer PI-Färbelösung, bestehend aus PI (40 µg/ml, Santa Cruz), Natriumcitrat (0,1%, Sigma), Triton X-100 (0,1%, Serva), für 1h inkubiert. Der DNA-Gehalt der Kerne wurde unter Verwendung des Fluoreszenzdetektors FL-3 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest Software.

### **3.4.3 Nachweismethode - Viabilität/Vitalität**

Der Nachweis der Viabilität und Vitalität erfolgte mittels Calcein-Assay. Calcein-AM (AM = Acetoxymethylester) bezeichnet. Veresterte Carboxygruppen blockieren die Fluoreszenz. Calcein-AM kann durch die Zellmembran hindurch in lebende Zellen transportiert werden. Die Acetoxymethyl-Gruppe maskiert den Molekülteil, der in der Lage ist, Calcium zu chelatisieren. Nach dem Transport in die Zelle werden die Acetoxymethyl- und die Acetatgruppen enzymatisch durch Esterasen abgespalten und in Calcein umgewandelt. Dieses ist dann in der Lage, Calciumionen innerhalb der Zelle zu binden (zu komplexieren), was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert. Calcein ist kaum zytotoxisch, da es vitale Zellprozesse wie beispielsweise die Zellteilung nicht beeinflusst. Der Komplex verbleibt dabei in der Zelle, da er die Zellmembran nicht selbst passieren kann. Jedoch verfügen viele Zellen

über einen ABC-Transporter, der aktiv Calcein aus der Zelle ausschleust. Diese Zellen leuchten dann ebenfalls nicht.

Da abgestorbene Zellen über keine aktiven Esterasen verfügen und deshalb kein Calcium-bindendes Calcein erzeugen können, werden lediglich lebende Zellen markiert. Diese fluoreszieren grün. Häufig wird zusätzlich ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, z. B. das Ethidium-Homodimer-1, welches durch beschädigte Zellmembranen in die Zelle eindringen und dort an Nukleinsäuren binden kann. So werden abgestorbene Zellen rot gefärbt und können deutlich von lebenden Zellen unterschieden werden.

### Das Protokoll

Die Zellernte erfolgte aus 24-well Kulturen. Jedes Well wurde mikroskopisch überprüft. Überstände (ca. 500 µl) in beschriftete FACS-Röhrchen überführen. Die Zellen in den Wells wurden gewaschen (1 ml PBS). PBS-Waschlösung wurden wieder in gleiche FACS Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert (100 µl T/E je 24-well) und anschließend geerntet indem die Reaktion gestoppt (1 ml PBS mit 10 % FCS) und der Überstand überführt. Die FACS-Röhrchen wurden zentrifugiert (283 g / 8 min). Überstände wurden vorsichtig, einzeln und sofort abgesaugt. Die Zellen wurden erneut gewaschen, nochmals zentrifugiert (283 g / 8 min) und die Überstände vorsichtig, einzeln und sofort abgesaugt. Ab hier wurden die Zellen möglichst wenig Licht ausgesetzt. Das „Pellet“ wurde resuspendiert (200 µl Calcein Arbeitslösung) und anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C (CO<sub>2</sub> Inkubator) für 1 h. Danach wurden die Zellen mit 1 ml kaltem PBS verdünnt, nochmals zentrifugiert (283 g / 8 min) und die Überstände vorsichtig, einzeln und sofort abgesaugt. Das pellet wurde resuspendiert (200 µl kaltem PBS) und auf Eis gestellt. Die Messung im FACS erfolgte umgehend.

### Calcein Aliquots

Calcein AM (viability dye; eBioscience; 65-0853-81); bei -20°C

### Calcein Stocklösung (5 mg/ml, -20°C)

Calcein-Aliquot (50 µg)	1x
DMSO (wasserfrei)	10 µl

### Calcein Verdünnung (1:100; 50 µg/ml; immer frisch angesetzt, auf Eis)

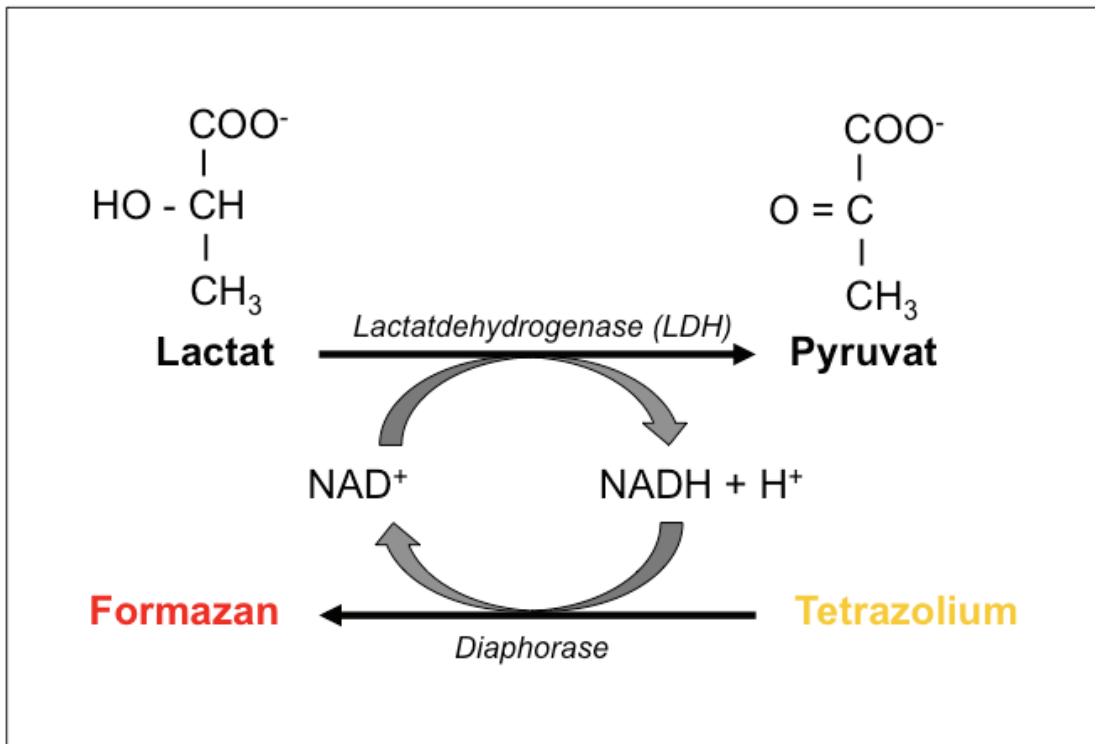
PBS (kalt)	99 µl	247,5 µl
Calcein Stock	1 µl	2,5 µl

Calcein Arbeitslösung (1:20, 2,5 µg/ml; sofort einsetzen)

	<u>je well</u>	<u>x25</u>
Medium (kalt)	190 µl	4,75 ml
Calcein Verdünnung	10 µl	250 µl/gz

#### **3.4.4 Nachweismethode - Zytotoxizität/Nekrose**

Der Nachweis der Zytotoxizität erfolgte mittels Laktatdehydrogenase (LDH) Nachweis. Der LDH Gehalt wird im Zellkulturüberstand mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (LDH, Roche Applied Science; 11644793001) ermittelt. Durch mechanische Schädigung, Strahlung oder chemische Beeinflussung, kann es zur Schädigung der Plasmamembran und zum Platzen der Zellen kommen. Dabei wird unter anderem das Enzym Laktatdehydrogenase freigesetzt und kann im Zellkulturüberstand nachgewiesen und auch quantifiziert werden. Dafür werden zwei enzymatische Reaktionen ermittelt. Als Erstes wird durch die Oxidation von von Laktat zu Pyruvat,  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert. Im zweiten Schritt wird  $\text{H}^+/\text{H}^+$  auf ein Tetrazoliumsalz übertragen, welches zu Formazan reduziert wird. Hierdurch entsteht ein Farbumschlag (Abb.12). Die LDH Aktivität im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen.



**Abbildung 12: Prinzip der Zytotoxizitätsbestimmung.** Die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Nachfolgend wird  $\text{H}^+/\text{H}$  auf das Tetrazolium-Salz (gelb) übertragen, wodurch das photometrisch quantifizierbare Formazan-Salz (rot) entsteht. (Abbildung erstellt entsprechend dem Datenblatt des Assays)

Das Protokoll: Der Zytotoxizitäts-Nachweis erfolgte parallel zur Propidiumjodid-Färbung. 10  $\mu\text{l}$  des zellfreien Zellkulturüberstandes wurden abgenommen, 1:4 mit PBS verdünnt und in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung wurde die Platte für 20 min in Dunkelheit und unter ständigem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung, mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000) bei 490 nm. Zur Auswertung des Versuchs wurde der Medium wert (blank-Wert) von allen anderen Werten abgezogen. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf den Wert 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

### 3.4.5 Nachweis Proliferation - Wachstumskurven

Die Echt-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis, RTCA, xCELLigence, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) ist eine Methode zur Messung und Erstellung von Wachstumskurven. Die Messtechnik basiert auf Mikroelektroden, die auf dem Boden jedes Wells einer

speziellen 96-Well E-plate integriert sind. Der elektrische Widerstand der Zellen, gemessen in einem Well steht in direktem Verhältnis zur Zelldichte.

Das Protokoll: Pro Well wurden 2.500 Zellen ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen Reagenzien in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen behandelt. Die Messung wurde über einen Zeitraum von etwa 100 h in Mess-Intervallen zwischen 15 Minuten und 1 Stunde durchgeführt.

### **3.4.6 Nachweismethode - mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ )**

Zum Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) wurde der nicht toxische, kationische Farbstoff Tetramethylrhodamin Methylester-Perchlorate (TMRM<sup>+</sup>, T5428, Sigma) verwendet. Der Nachweis erfolgt durch die Anreicherung des positiv geladenen Farbstoffes in den negativ geladenen Mitochondrien. Verminderte TMRM<sup>+</sup>-Fluoreszenz zeigt eine Störung in der Ladungstrennung der Mitochondrien im Durchflusszytometer an.

Das Protokoll: Durch Trypsinieren wurden die Zellen geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l TMRM<sup>+</sup>-Lösung (1  $\mu$ M) resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und umgehend im Durchflußzytometer gemessen (FL-2, 20.000 Zellen). Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI Software, Version 2.9.

### **3.4.7 Nachweismethode - ROS (reactive oxygen species)**

Durch den Farbstoff H<sub>2</sub>DCFDA (2-, 7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA Substanz: oder Life Technologies, D-399); MG: 487 g/mol; Menge: 100 mg Stockkonzentration: 50 mM; Arbeitskonzentration: 10  $\mu$ M (Verdünnung: 1 : 5000) wurde das Auftreten von intrazellulären ROS nachgewiesen.

Das Protokoll: Durch Trypsinieren wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mit H<sub>2</sub>DCFDA (50  $\mu$ M) für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und umgehend im Durchflußzytometer gemessen (FL-3, 20.000 Zellen) gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI Software, Version 2.9.

### **3.4.8 Protein Analyse (Western-Blot)**

Die hier verwendete Methode ist die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die denaturierten und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode. Ein Molekulargewichtsstandard (161-

0374, Bio-Rad) dient als Referenz zur Bestimmung der Größe der Proteine. Die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, 0,2 µm, Whatman, Dassel) transferiert und können dort anschließend indirekt, durch die spezifische Bindung von primären Antikörpern, nachgewiesen werden. Diese primären Antikörper werden ihrerseits durch sekundäre Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper gebunden. Die ECL-Reagenz (*enhanced chemilumineszenz*) kann die Meerrettich-Peroxidase umsetzen und es kommt zur Emittierung von Lumineszenzlicht, das den Nachweis von Antigenen auf Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE, Buckinghamshire, UK) ermöglicht.

### **3.4.9 Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysepuffer**

Eine exponentiell wachsende Zellkultur mit einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen wurde für die Herstellung von Proteinextrakten verwendet. Einen Tag vor der Extraktion wurde das Wachstumsmedium der Zellkultur gewechselt. Weitere Details des verwendeten Protokolls für die Herstellung von Proteinextrakten und die Durchführung der Western Blot Analyse wurden von Eberle (Eberle et al., 2003) im Detail beschrieben.

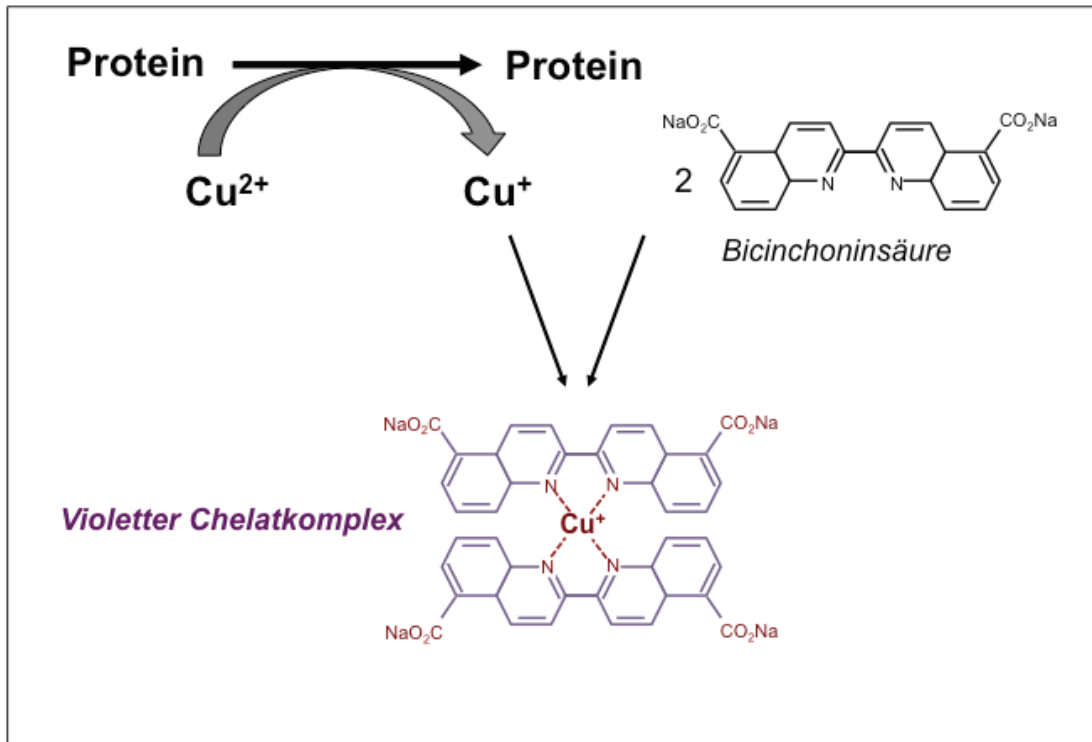
Das Protokoll: Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS (2 ml/Well) gewaschen, mit kaltem Standard-Lysepuffer (50 µl/Well) inkubiert, mit einem Zellschaber (99003; TPP, Trasadingen, Schweiz) abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Extrakte wurden für 5 Sekunden mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus, Typ MS-73, Bandelin, Berlin) behandelt. Dies führt zum Scheren der freigesetzte DNS. Anschließend wurde das Extrakt für 10 min bei 28341 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode. Die Lysate wurden anschließend bei -20°C gelagert.

### **3.4.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Methode**

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden (BCA Protein Assay, 23225, Thermo Fischer Scientific). Dieser Methode liegt die Biuret-Reaktion zugrunde. Die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium werden von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert.  $\text{Cu}^+$  reagiert mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelatkomplex (Abb.13). Die Absorption dieses Komplexes kann im ELISA-Reader gemessen werden.

Das Protokoll: Die Proteinextrakte und die Eichlösung wurden in Triplikaten in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden ausgelegt. Die Proteinextrakte wurden zur Bestimmung 1:10 in PBS verdünnt. 10 µl davon wurden pro Well vorgelegt und mit 200 µl Reaktionspuffer

inkubiert. Der Reaktionspuffer setzte sich aus Lösung A (4  $\mu\text{l}$ ) und Lösung B (196  $\mu\text{l}$ ) zusammen und wurde immer unmittelbar vor jeder Versuchsdurchführung angesetzt. Als Eichlösung diente eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Die so ausgelegte Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Platten-Reader vermessen. Bezogen auf die bekannten BSA-Konzentrationen, konnte die Proteinmenge der Lysate bestimmt werden.



**Abbildung 13: BCA-Nachweismethode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen.** (A) Bicinchoninsäure-Molekül (BCA); (B) Biuret-Reaktion bei der Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen reagieren; (C) Ausbildung des violetten  $\text{Cu}^{+}$ -Bicinchoninsäure-Komplexes (verändert nach Thermo Fischer Scientific Datenblatt)

### 3.4.11 Elektrophorese-Protokoll

Das für die SDS-PAGE benötigten Gele, bestehend aus einem Sammelgel (5 %) und einem Trenngel (12 %) wurden mit Hilfe des Elektrophoresesystems (Mini Protean II, BioRad) vor der Elektrophorese selber hergestellt. Als Erstes wurde das Trenngel angesetzt, sofort gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und der Zwischenraum zwischen den Platten mit Filterpapier nachgetrocknet. Danach wurde das Sammelgel darüber geschichtet und ein Gel-Kamm, zur

Herstellung der Taschen, in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Lysate wurden mit Protein-Probenpuffer (4-fach) versetzt und 5-8 min bei 95°C denaturiert. Die Gel-Kämme wurden nach vollständiger Polymerisation entfernt, die Taschen wurden gespült und so von Luftblasen befreit. Die fertigen Gele werden mit den Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer (1-fach) bedeckt. Die Proben werden in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 80V gestartet. Ist die Lauffront gut in das Sammelgel gelaufen wird die weitere Elektrophorese bei 120-150V weitergeführt, solange, bis die blaue Lauffront das untere Ende der Gele erreicht hat.

Verwendete Puffer und Reagenzien – Elektrophorese:

Sammelgel (5%-ig) für 2 Gele: Aqua bidest 3,1 ml, Polyacrylamid (30 %) 1,3 ml, Trenngelpuffer 1,25 ml; SDS (10%) 0,05 ml; APS 100 µl (10%); TEMED 5l µl.

Sammelgelpuffer (pH 6,8) 500 ml: Tris-Base 19,7 g (T1503, Sigma); SDS 1,0 g; Aqua bidest ad 500 ml.

Trenngel (15%-ig) für 2 Gele: Aqua bidest 3,5 ml, Polyacrylamid (30 %) 5,3 ml, Trenngelpuffer 2,1 ml; SDS (10%) 0,106 ml; APS 200 µl (10 %); TEMED 20 µl.

Trenngel (12%-ig) für 2 Gele: Aqua bidest 3,9 ml, Polyacrylamid (30 %) 4,2 ml, Trenngelpuffer 2,1 ml; SDS (10%) 0,106 ml; APS 200 µl (10 %); TEMED 20 µl.

Trenngelpuffer (pH 8,8) 500 ml: Tris-Base 38,5 g; Tris-HCl 9,3 g; SDS 1,0 g; Aqua bidest ad 500 ml.

Protein-Probenpuffer (4x) 10ml: Tris-HCl 2,5 ml (1M, pH 6,8; T3253, Sigma); SDS 0,2 g (L-4390, Sigma); Glycerin 4 ml (1.04093, Merck); Bromphenolblau 4 mg (Biorad); Aqua bidest. 1,5 ml. 20% β-Mercaptoethanol (M-7154, Sigma) wurde jeweils frisch zu den einzelnen Protein-Probenpuffer-Gemischen pipettiert.

Laufpuffer nach Laemmli (5x) 2 l: Tris-Base 30,4 g; Glycin 144 g (23390, Serva); SDS 10 g; Aqua bidest ad 2 l.

Das Protokoll: Der Blot wurde so ein einer Kammer zusammengebaut, dass das Gel zur Kathode zeigte und die Nitrozellulosemembran zur Anode. Die Außenseiten wurden mit jeweils zwei zugeschnittenen Filterpapiereblättchen und je einen Schwamm belegt damit eine gleichmäßige und dauerhafte Befeuchtung gewährleistet war. Der Blot wurde im Blotpuffer blasenfrei aufeinander geschichtet. Der Protein-Transfer erfolgte entweder bei 100V für 1,5 Stunden auf Eis oder über Nacht bei 10V und Raumtemperatur.

Zum TransfERNachweis wurden die Proteinbanden auf der Membran mittels PonceauS (P-7170, Sigma) angefärbt und die Membranen eingescannt. Die reversible Färbung der



Membran wurde anschließend mit PBS-Tween vollständig abgelöst. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur mit Trockenmilchpulver (4,5 %) in PBS-Tween inkubiert. Damit wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockiert.

Verwendete Puffer und Reagenzien – Protein-Transfer:

Transferpuffer (1x) 2 l: Tris-Base 11,64 g; Glycin 4,36 g; SDS 3,7 g; Methanol 400 ml; Aqua bidest ad 2 l.

Phosphat-buffered Saline (PBS)-Tween (0,05 %): PBS Dulbecco 9,55 g (L182-50, Biochrom); Tween20 0,5 ml (P-9416, Sigma); Aqua bidest ad 1 l.

Blockierlösung (4,5 %): Fettfreies Trockenmilchpulver (blotting grade) 4,5 g (170-6404, Bio-Rad); PBS-Tween 0,05 % ad 100 ml.

Das ECL wurde kurz vor Gebrauch gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach 2 Minuten Inkubationszeit wurde die Membran zwischen zwei Folien in eine Röntgenfilmkassette gelegt und Röntgenfilme in einer Dunkelkammer aufgelegt. Der erste Film wurde immer nach 3 Minuten entwickelt. Ausgehend von diesem Film wurde die Länge der Exposition für die weiteren Filme festgelegt. Zur Auswertung wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm anhand des Proteinmarkers und der gegebenenfalls aufgetragenen Positivkontrollen ausgewertet.

Verwendete Puffer und Reagenzien ECL: 20 x Lumiglo Reagenz und 20 x Peroxid von Cell Signaling. Die Entwicklungslösung wurde frisch angesetzt und sofort verwendet.

Lösung A: Lumiglo 20 x (z.B. 0,5 ml)

Lösung B: Peroxid 20 x (z.B. 0,5 ml)

Lösung C: Aqua bidest 1 x (z.B. 10 ml)

### **3.4.12 Verwendete Antikörper: Western-Blot Analyse**

Verwendete primäre Antikörper von Santa Cruz: Bax (N-20, sc-493,1:200); Bak (G-23, sc-832, 1:200); Bcl-2 (sc-509, 1:200); GAPDH (6C5, sc-32233, 1:1000); Mcl-1 (sc-12756, 1:200); p53 (C-5, sc-7386, 1:500); p21 (sc-6246, 1:200)

Verwendete primäre Antikörper von Cell Signalling: Caspase-8 (#9746, 1C12, 1:1000); Caspase-9 (#9502, 1:1000); Caspase-3 cleavage products (#9661, Asp175, 1:1000); Procaspase-3 (#9662,1:1000)

Verwendete primäre Antikörper von Leica Biosystems: AURKA (JLM28, 1:750)

Verwendete sekundäre Antikörper: Horseradishperoxidase (Hrp)-markierte Ziege anti-Maus IgG-, Ziege anti-Kaninchen IgG- und Kaninchen anti-Ziege IgG-Antikörper (Dako Cytomation, Hamburg, 1:5000).

### **3.4.13 Herstellung von Zellfraktionierungslysaten**

Zur Bestimmung von, aus den Mitochondrien freigesetzten Faktoren (Cytochrom C, p53), wurden die Mitochondrien aus den zu analysierenden Zellen mit Hilfe eines Mitochondrien-Fraktionierungsprotokolls isoliert.

Das Protokoll: Das Medium wurde aus den Wells entnommen und anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgekippt und es wurde erneut 1 ml kaltes PBS pro Well zugefügt. Die Zellen wurden vom Boden der Wells geschabt und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Wells mit 1 ml kaltem PBS nachgespült und der Überstand ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 429 g für 7,5 Minuten bei 4°C. Der so entstandene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese wurden dann erneut zentrifugiert bei 32869 g für 1 Minute bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen.

Dann wurden die Puffer entsprechend vorbereitet. Das Pellet wurde in 150 µl Puffer B resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 2054 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Der so entstandene Überstand stellte die Zytosolfraktion dar und musste extrem vorsichtig abgenommen werden.

Das Pellet wurde mit 500 µl Puffer A gewaschen und anschließend bei 2054 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Puffer B resuspendiert und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 32869 g für 15 Minuten bei 4°C. der so entstandene Überstand stellte die Kernfraktion dar und wurde extrem vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Puffer A: (bei 4°C aufbewahren) 1 M HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure ((pH 7,9)), 1 M Magnesiumchlorid, 1 M Kaliumchlorid, Aqua bidest ad 50 ml

Puffer A wird vor Verwendung frisch mit 0,1 % Triton angesetzt.

Puffer B: (bei 4°C aufbewahren) 1 M HEPES, 100 % Glycerol, 5 M Natriumchlorid, 1 M Magnesiumchlorid, 0,5 M EDTA (pH 8,0), Aqua bidest ad 50 ml

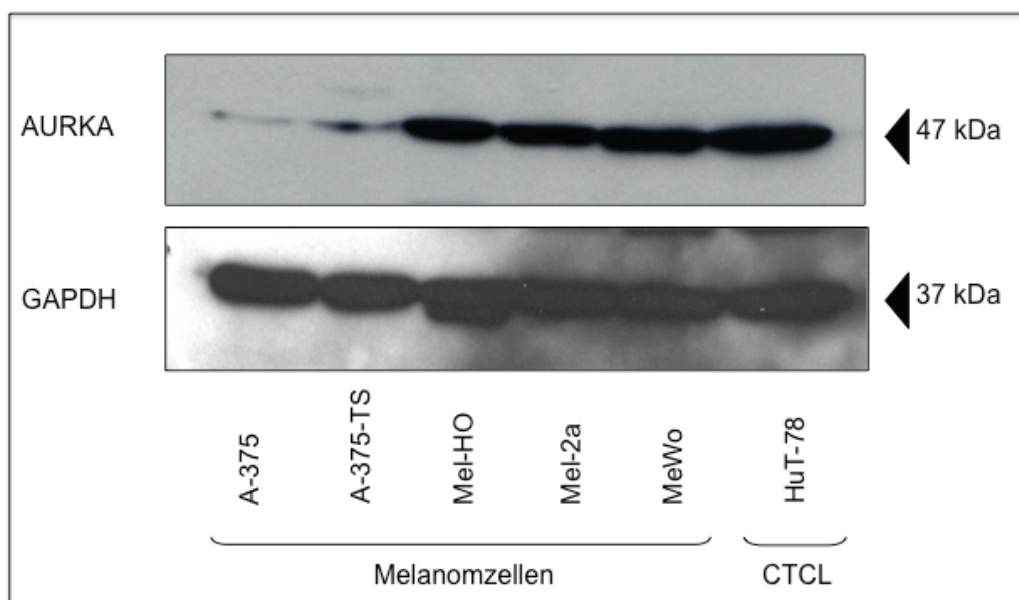
### **3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Jedes Experiment wurde mindestens 2 Mal wiederholt. Es wurden immer Dreifachwerte bestimmt. Der Mittelwert aus drei von einander unabhängigen Experimenten wurde zur Auswertung der Experimente herangezogen. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden mit Excel berechnet. Die Signifikanz wurde mit einem unpaaren t-Test, durch einen t-Test von Graph Pad Software berechnet. Dabei wurden p-Werte von unter 0,05 als signifikant bewertet und p-Werte von unter 0,01 als hochsignifikant bewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Basisexpression von Aurorakinase-A in verschiedenen Melanomzelllinien

Aurorakinase A (AURKA) wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten untersucht und es wurde häufig eine Überexpression in Tumorzellen beschrieben. Die Melanomzelllinien A-375, A-375-TS, Mel-HO, Mel-2a und MeWo wurden auf Proteinebene durch eine Western-Blot-Analyse auf ihre AURKA-Basisexpression überprüft. Als Kontrolle wurde die Zelllinie HuT-78 aufgetragen, eine kutane T-Zelllymphomlinie, für die erst kürzlich eine Überexpression von AURKA beschrieben wurde (Hummel et al. 2015). Die Zellen wurden für 24 h mit 200 nM Alisertib behandelt und anschließend lysiert. Die so hergestellten Proteinextrakte wurden für die Analyse im Western-Blot verwendet.

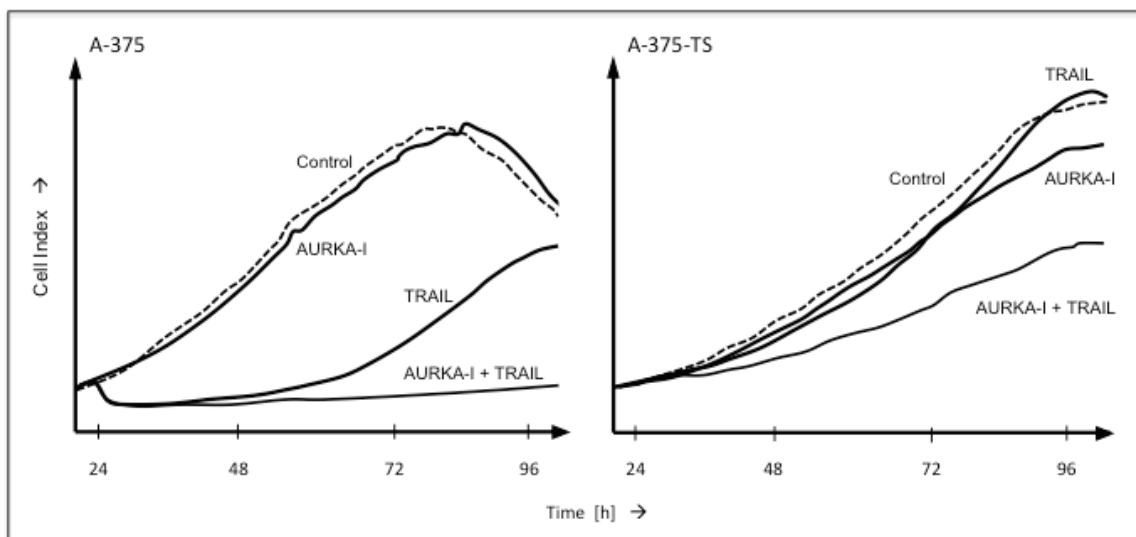


**Abbildung 14: Basisexpression von Aurorakinase-A auf Proteinebene in verschiedenen Melanomzelllinien.** Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Proteinexpression in fünf verschiedenen Melanomzelllinien untersucht. Als Positivkontrolle diente HuT-78, eine CTCL-Zelllinie, bei der eine Überexpression von AURKA bereits nachgewiesen wurde. Die für die Lysate verwendeten Zellen wurden mit 200 nM Alisertib für 24 h behandelt. Eine gleichmäßige Proteinbeladung von 30 µg pro Gelstache wurde mit GAPDH überprüft. Das Experiment wurde zweimal mit unabhängigen Lysatreihen durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

AURKA war in allen untersuchten Melanomzelllinien exprimiert, wobei besonders Mel-HO, Mel-2a und MeWo eine mit HuT-78 vergleichbare Expressionsstärke aufwiesen. Die Melanomzelllinien A-375 und A-375-TS zeigten im Vergleich dazu eine deutliche aber schwächere Expression (Abb. 14).

## 4.2 Wirkung des AURKA-Inhibitors Alisertib auf die Zellproliferation von Melanomzelllinien

Um die Wirkung von Alisertib auf die Zellproliferation von Melanomzellen zu untersuchen, wurde eine Echtzeit-Zellanalyse durchgeführt (Real Time Cell Analyzer, RTCA), bei der über einen Zeitraum von bis zu 96 h kontinuierlich Zellwachstum und Zelladhäsion gemessen wurden. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Alisertib (50 nM – 500 nM), TRAIL (20 ng/ml) und der Kombination behandelt (Abb. 15).



**Abbildung 15: Wirkung von Alisertib und TRAIL auf die Proliferation von A-375- und A-375-TS-Zellen** Die Abbildung zeigt die Proliferationsraten von mit Alisertib und TRAIL behandelten A-375-Zellen und A-375-TS-Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen als Kontrollen. Die Wachstumskurven wurden durch eine Echtzeit-Zellanalyse erstellt. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente mit jeweils Dreifachwerten

In den Proliferationsanalysen konnte eine Hemmung der Zellproliferation durch den AURKA-Inhibitor Alisertib gezeigt werden. Nach Behandlung von A-375 und A-375-TS mit Alisertib zeigte sich keine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion des Zellwachstums, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dies war auch nach 72 h noch anhaltend (Abb. 17). In der Kombinationsbehandlung mit TRAIL (20 ng/ml) zeigte sich eine deutliche Verstärkung des antiproliferativen Effekts von TRAIL in den A-375 und A-375-TS.

### 4.3 Alisertib sensitiviert für die TRAIL-induzierte Apoptose

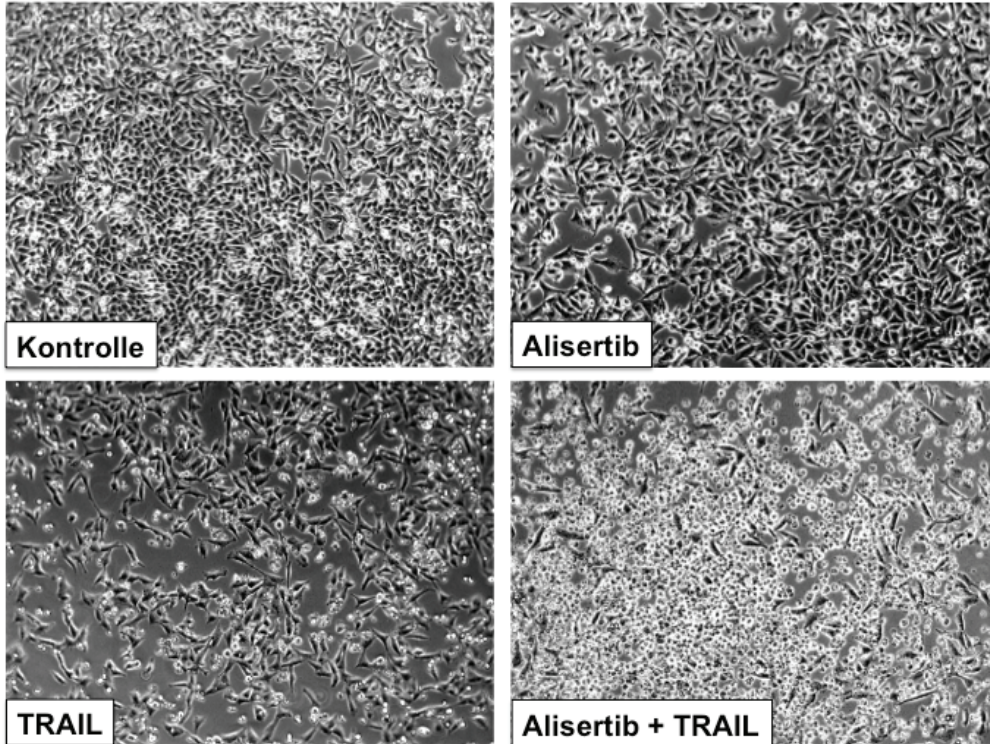
Um die Wirkung einer Alisertib-Behandlung auf TRAIL-resistente Melanomzelllinien zu überprüfen, wurde eine Reihe von TRAIL-sensitiven und TRAIL-resistenten Melanomzelllinien nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL untersucht. Die Zelllinie A-375 ist dabei sensitiv für die TRAIL-induzierte Apoptose, entwickelt allerdings sehr schnell eine Resistenz gegenüber TRAIL. Dies führte zur Entwicklung eines induzierbaren Resistenzmodells durch kontinuierliche Kultivierung mit TRAIL. Diese selektiert-resistente Zelllinie, die im Nachfolgenden als TRAIL-selektierte (-TS) Zelllinie (A-375-TS) bezeichnet wird, wurde zur Untersuchung des Resistenzmechanismus herangezogen. Darüber hinaus wurden moderat TRAIL-sensitive Zellen (Mel-HO) und Zelllinien, die gegen TRAIL weitgehend resistent sind (Mel-2a, MeWo) untersucht.

Die Behandlung der Zellen erfolgte für 24 h mit TRAIL und Alisertib bzw. deren Kombination. Die Konzentrationen betragen 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM und in den stark resistenten Zelllinien bis zu 1000 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL. Bereits in Kultur konnte die Wirkung der Behandlungen aufgrund der Zellmorphologie bewertet werden. Offensichtliche Charakteristika der Apoptose wie reduzierte Zellzahl, abgerundete und abgelöste Zellen konnten bereits unter dem Mikroskop festgehalten werden. Die Quantifizierung von apoptotischen und hypodiploiden Zellen (sub-G1-Zellpopulation) erfolgte im FACS (Fluorescence activated cell sorting), einer durchflusszytometrischen Analyse von Propidiumjodid (PI) gefärbten Zellkernen. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation konnte so dargestellt werden.

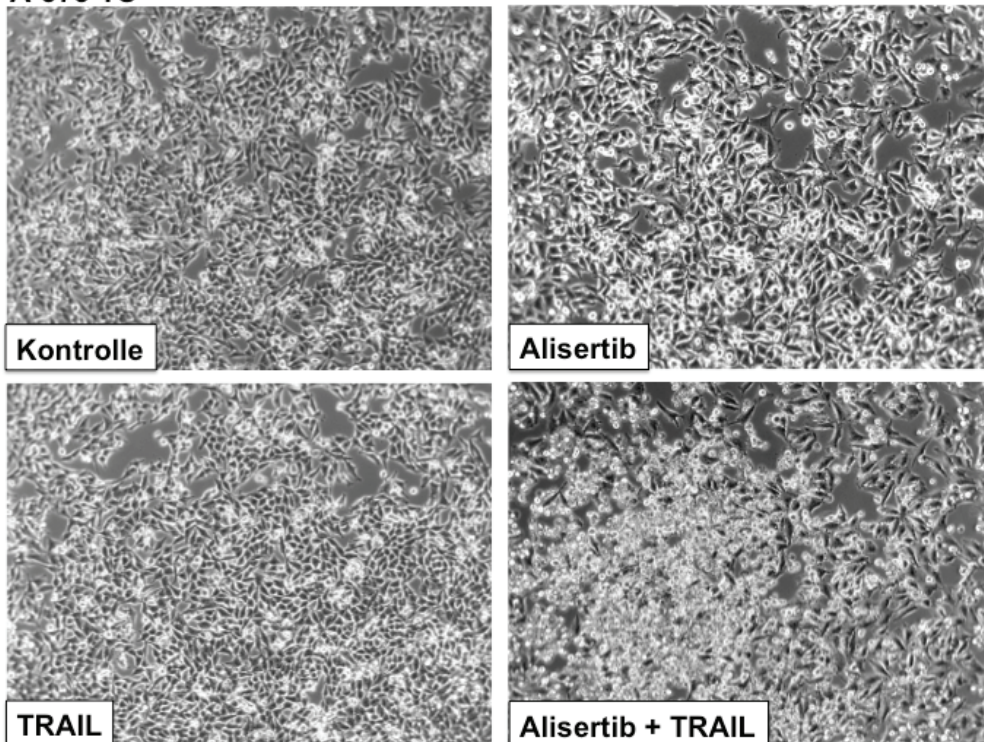
Darüber hinaus lässt sich mit diesem Analyseverfahren auch eine Zellzyklusanalyse durchführen, in der die verschiedenen Zellpopulationen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus identifiziert werden können. Die Behandlung von A-375- und A-375-TS-Zellen mit TRAIL (20 ng/ml) führte zu morphologischen Veränderungen. Die typischerweise dendritisch geformten A-375 und A-375-TS wachsen adhäsiv und flächig. Eine reduzierte Dichte mit abgelösten Zellen, und abgerundeter Form deutet auf abgestorbene Zellen hin. Nach der Behandlung mit TRAIL zeigte sich auch eine deutlich reduzierter Zelldichte und abgerundeten und abgelösten Zellen in den TRAIL-sensitiven A-375-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Bei den TRAIL-selektierten, resistenten A-375-TS-Zellen zeigten sich keine, unter dem Lichtmikroskop sichtbaren, morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit Alisertib (200 nM) führte in beiden Zelllinien zu einer moderat reduzierten Zelldichte und einem moderaten Anstieg abgelöster und abgerundeter Zellen. Die Kombinationsbehandlung führte in beiden Zelllinien zu starken morphologischen Veränderungen mit zum größten Teil abgelösten und abgerundeten Zellen (Abb. 16).



**A-375**



**A-375-TS**



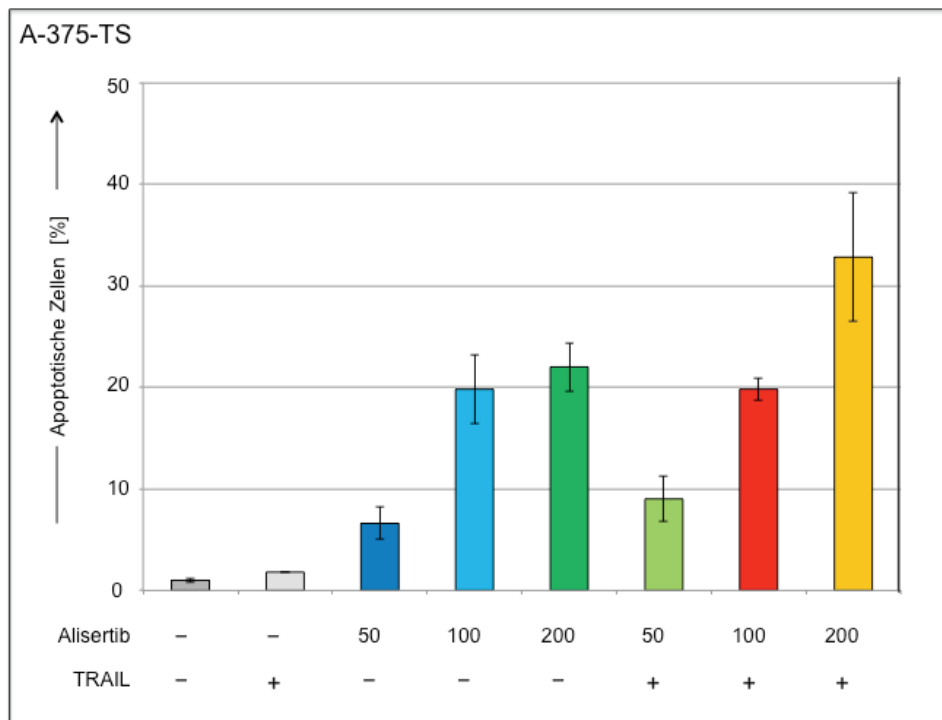
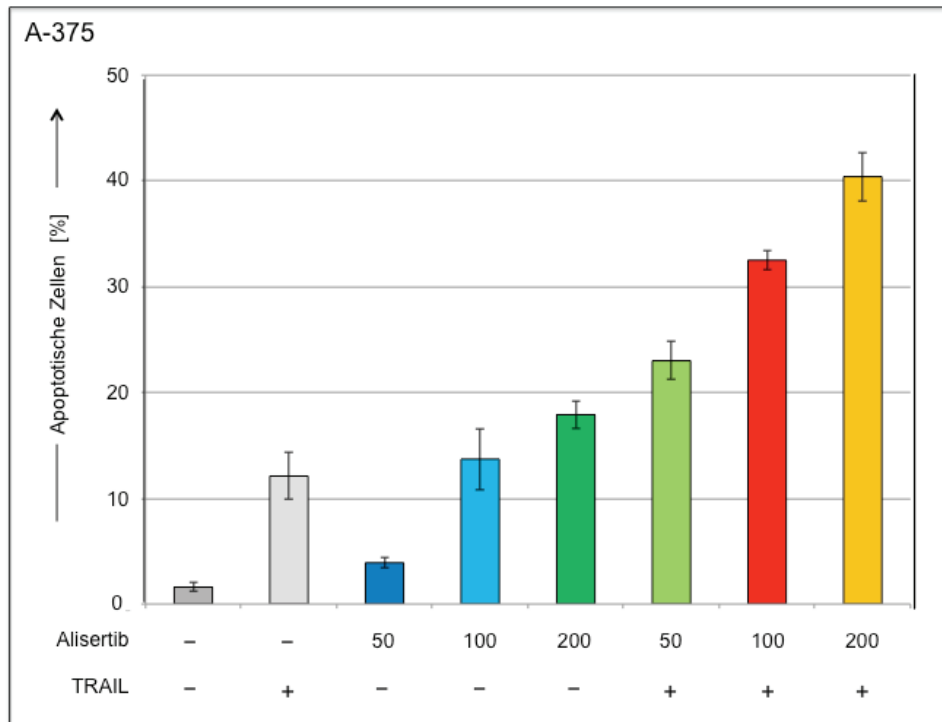
**Abbildung 16: Zellmorphologie von A-375- und A-375 TS-Zellen nach Behandlung mit TRAIL, Alisertib und der Kombination** Die Zellmorphologie wurde in 100facher Vergrößerung fotografiert, nachdem die Zellen 24 h zuvor behandelt wurden. Die Experimente sind mindestens dreimal wiederholt worden mit jeweils Dreifachwerten.



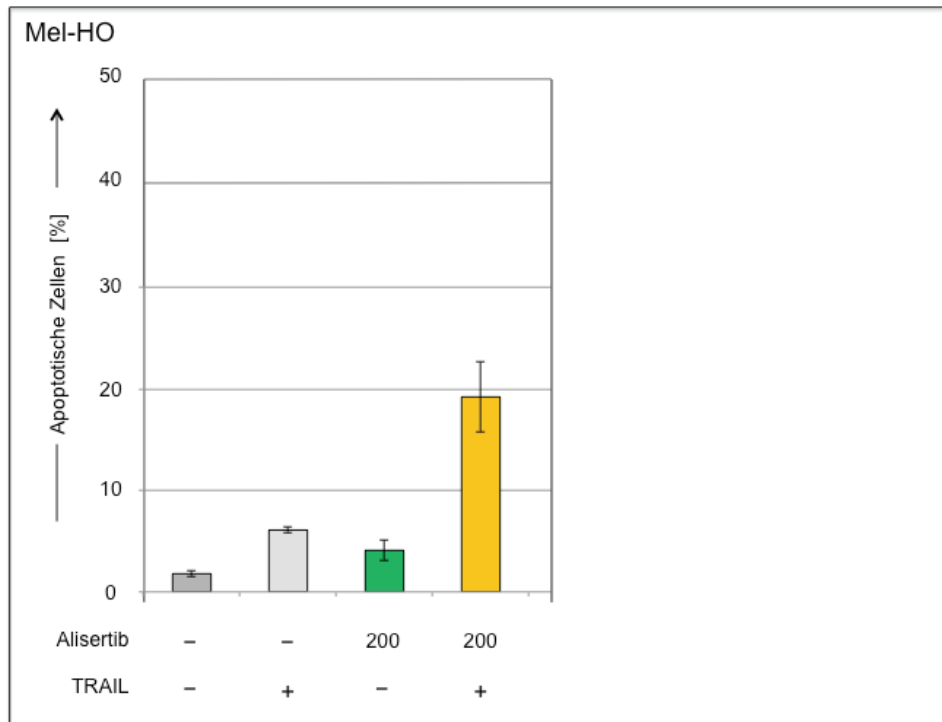
In den A-375-Zellen führte die Behandlung mit TRAIL zu einem Anstieg der Sub-G1-Population und zu Apoptoseraten zwischen 12,15 %. Die Behandlung mit Alisertib induzierte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Sub-G1-Population. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 50 nM, 100 nM und 200 nM Alisertib und führten zu 3,87 % (50 nM), 13,7 % (100 nM) und 17,88 % (200 nM) Apoptose (Abb. 18a). Die Kombination von Alisertib und TRAIL zeigte eine deutliche Zunahme der Apoptose. Diese Zunahme war von 5 % (mit Alisertib 50 nM) und 12,15 % (mit TRAIL 20 ng/ml) auf 23,03 % in der Kombination. Die Kombination von Alisertib 100 nM und TRAIL 20 ng/ml führte zu 32,5 % apoptotischer Zellen bzw. 40,37 % mit Alisertib 200 nM plus TRAIL 20 ng/ml.

In A-375-TS-Zellen, in denen TRAIL kaum in der Lage ist Apoptose zu induzieren, konnte die Kombinationsbehandlung ebenfalls zu einer Erhöhung der Sub-G1-Population beitragen. Während die Behandlung mit TRAIL (20 ng/ml) nur zwischen 1,75 % Apoptose induzierte und damit teilweise im Bereich der basalen Apoptose lag, konnte die Behandlung mit Alisertib konzentrationsabhängig 6,57 % (50 nM), 19,83 % (100 nM) und 21,99 % (200 nM) Apoptose induzieren (Abb. 17a). Die Kombinationsbehandlung konnte 9,00 % (50 nM Alisertib plus 20 ng/ml TRAIL), 19,78 % (100 nM Alisertib plus 20 ng/ml TRAIL) und 32,8 % (200 nM Alisertib plus 20 ng/ml TRAIL) Apoptose induzieren.

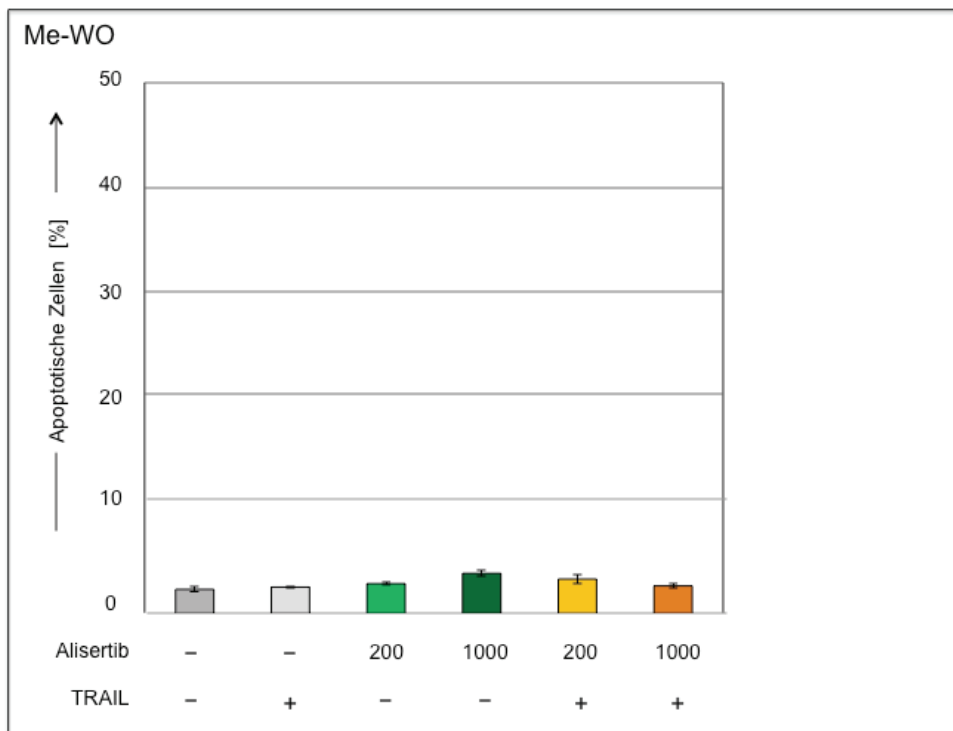
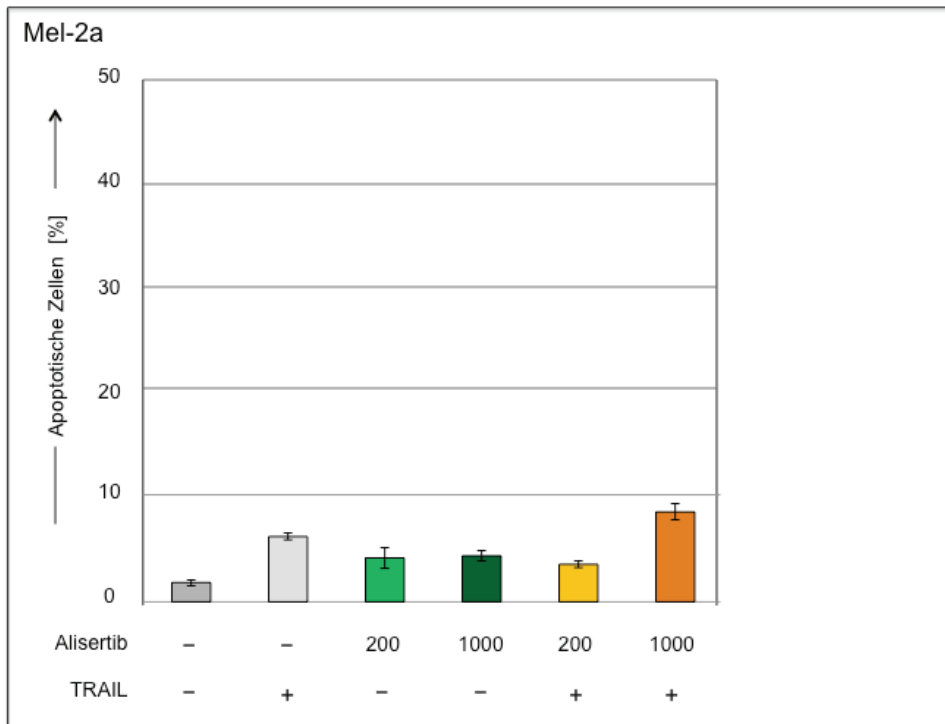
Bei den moderat sensitiven Zellen (Mel-HO) konnte die Kombinationsbehandlung mit TRAIL die Apoptose von 6,10 % durch 200 nM Alisertib (4,10 %) auf 19,20 % in der Kombination mit TRAIL erhöhen (Abb. 17b). Eine Behandlung der permanent TRAIL-resistenten Zellen (Mel-2a und MeWo) führte nicht zu einer signifikanten Apoptoseinduktion (Abb. 17c).



**Abbildung 17a: Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Alisertib und TRAIL in A-375- und TS-Zellen** A-375-TS im Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 50, 100 und 200 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt mit Dreifachwerten. Das hier gezeigte Balkendiagramm wurde aus den Daten eines repräsentativ ausgewählten Experiments erstellt.



**Abbildung 17b: Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-HO-Zellen** Mel-HO im Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL. Das Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt mit Dreifachwerten. Das hier gezeigte Balkendiagramm wurde aus den Daten eines repräsentativ ausgewählten Experiments erstellt.

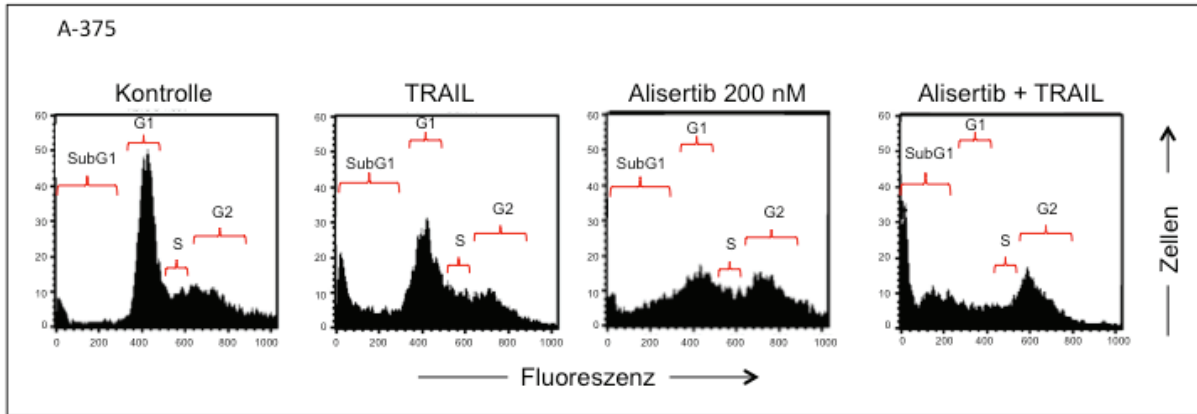


**Abbildung 17c: Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-2a und Me-WO-Zellen** Me-WO im Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 und 1000 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und 20 ng/ml TRAIL. Das Experiment wurde zweimal wiederholt mit Dreifachwerten. Das hier gezeigte Balkendiagramm wurde aus den Daten eines repräsentativ ausgewählten Experiments erstellt.

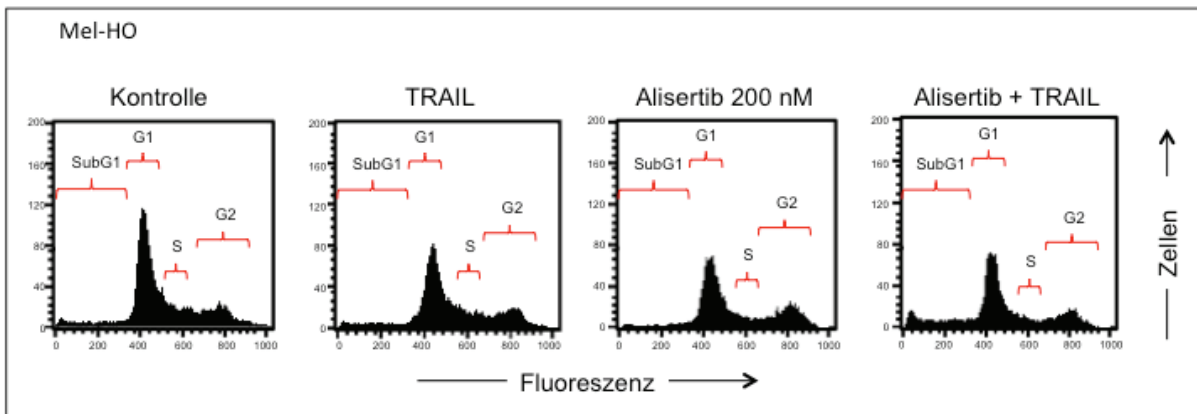
Die Ergebnisse der Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Alisertib und TRAIL zeigen, dass sowohl die individuellen Unterschiede in der Sensitivität in den unterschiedlichen Melanomzelllinien, als auch die eingesetzten Konzentrationen Einfluss auf die Apoptoseinduktion haben. In den TRAIL-selektierten A-375-Zellen konnte Alisertib für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren.

Die Analyse des Zellzyklus konnte ebenfalls im FACS vorgenommen werden. Die Population der sich im SubG1-Stadium befindlichen Zellen stellt den Anteil apoptotischer Zellen dar. Darüberhinaus können G1-Phase, S-Phase und G2-Phase unterschieden werden, sowie hyperploide Zellen. Die Arretierung von G1- oder G2-Phase kann neben der Induktion von Apoptose ebenfalls eine Wirkung von Chemotherapeutika sein. Für Alisertib wurde in anderen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem kutanen T-Zell-Lymphom, ein G2-Arrest beschrieben (Hummel et al., 2015).

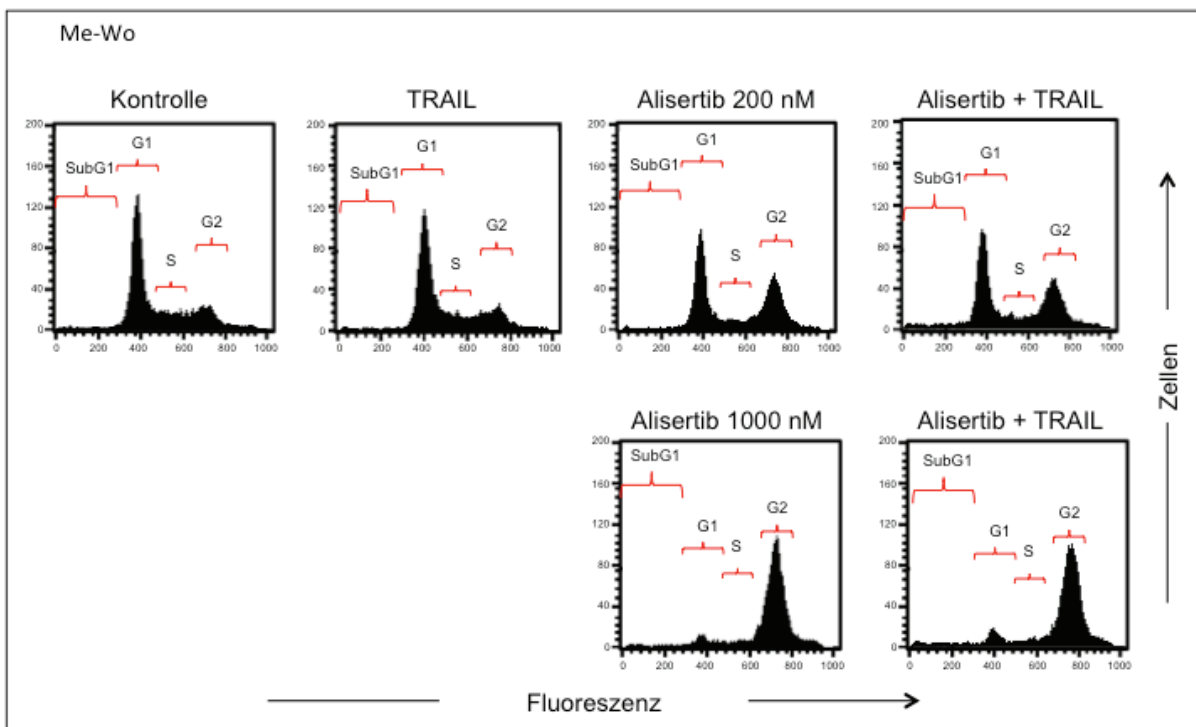
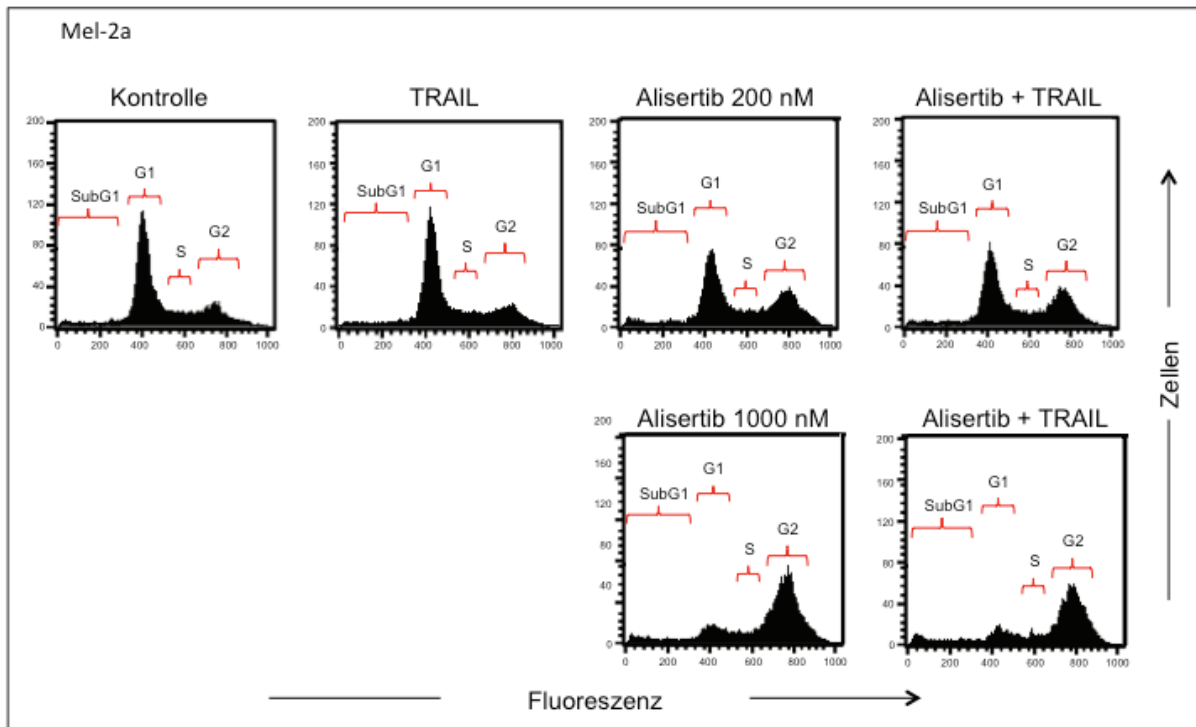
Die Behandlung mit 200 nM Alisertib für 24 h führt in allen verwendeten Zelllinien zu einem Anstieg der G2-Population, besonders deutlich ist dieses Ergebnis in den TRAIL-resistenten Mel-2a- und Me-Wo-Zellen. Die Wirkung ist dabei konzentrationsabhängig (Abb. 18a-c).



**Abbildung 18a: Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL in A-375-Zellen** A-375-Zellen wurden für den Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und 20 ng/ml TRAIL für 24 h behandelt. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt mit Dreifachwerten und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die hier gezeigten Graphen wurden repräsentativ ausgewählt.



**Abbildung 18b: Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-HO-Zellen** Mel-HO-Zellen wurden für den Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und 20 ng/ml TRAIL für 24 h behandelt. Das Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt mit Dreifachwerten und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die hier gezeigten Graphen wurden repräsentativ ausgewählt



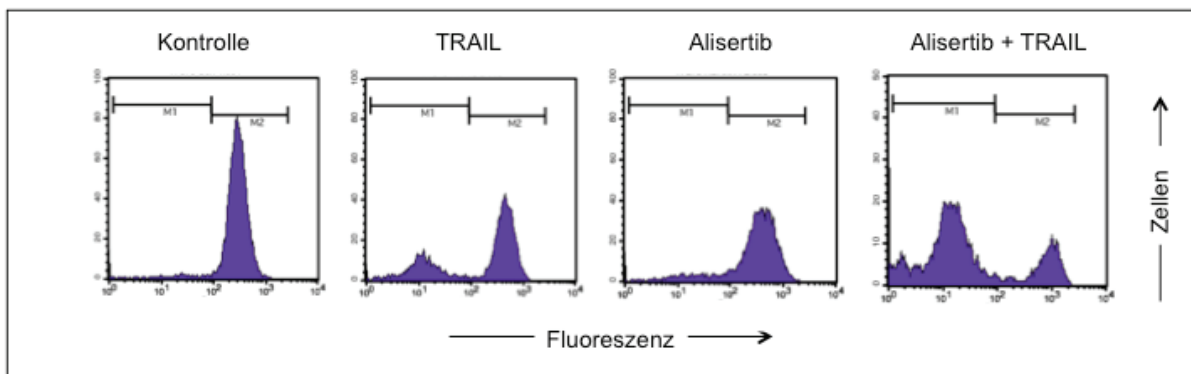
**Abbildung 18c: Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-2a- und Me-WO-Zellen** Mel-2a- und Me-Wo-Zellen wurden für den Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 nM und 1000 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und 20 ng/ml TRAIL für 24 h behandelt. Das Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt mit Dreifachwerten und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die hier gezeigten Graphen wurden repräsentativ ausgewählt.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der verwendeten Melanomzelllinien nach der Behandlung mit Alisertib zeigten einen deutlichen G2-Arrest. Dabei ist die Wirkung von Alisertib unabhängig von seiner Wirkung auf die Apoptose

#### 4.4 Überprüfung der Zellviabilität

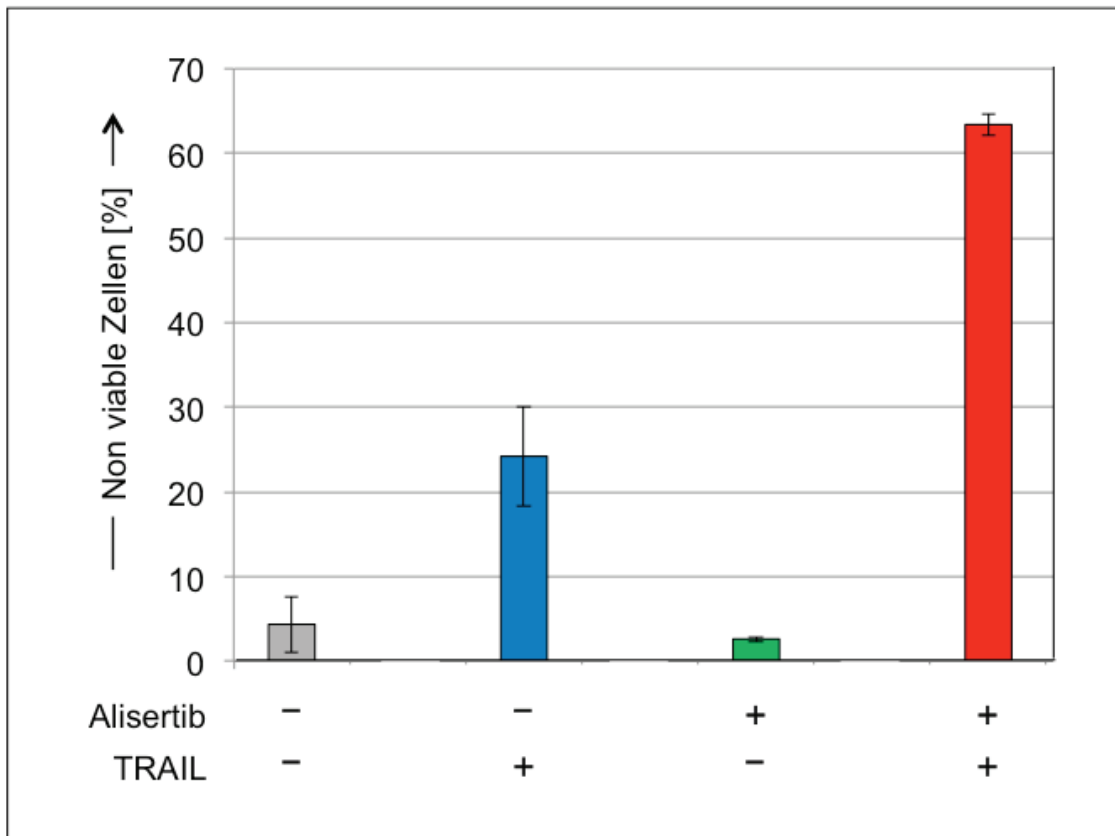
Die Analyse des Anteils apoptotischer Zellen stellt nur einen Teil der Wirkung von Alisertib dar. Zellen, die sich nicht vollständig in der Apoptose befinden, deren DNS-Fragmentierung noch nicht eingesetzt hat, können trotzdem durch eine Behandlung in ihren Vitalfunktionen beeinträchtigt und geschädigt sein. Eine fehlende oder zunächst reduzierte Esteraseaktivität ist charakteristisch für solche Zellen und kann durch den Nachweis mittels Calcein überprüft werden.

Hierfür wurden A-375-Zellen mit 200 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL für 24 h behandelt und mittels Calcein-Assay untersucht.



**Abbildung 19a: Einfluss von TRAIL und Alisertib auf die Viabilität von A-375-Melanomzellen**  
Messung der Zellviabilität mittels Calcein-Assay in A-375-Zellen, erfolgte 24 h nach Behandlung mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und +/- 20 ng/ml TRAIL. Behandelte Zellen sind mit violetten, geschlossenen Graphen dargestellt. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.



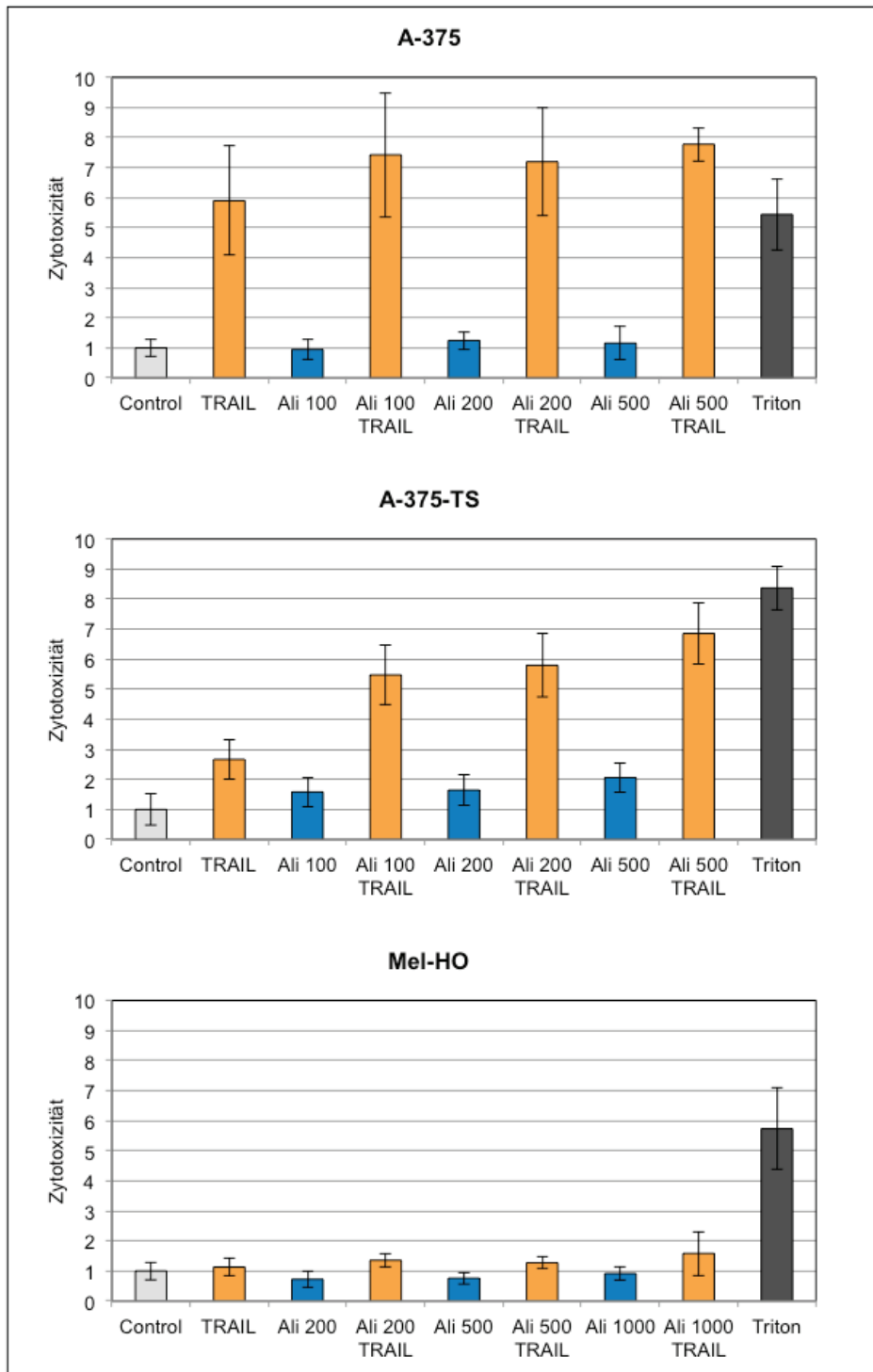


**Abbildung 19b: Quantitativer Einfluss von TRAIL und Alisertib auf die Viabilität von A-375-Melanomzellen** Die Messung der Zellviabilität mittels Calcein-Assay in A-375, erfolgte 24 h nach Behandlung mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und +/- 20 ng/ml TRAIL. Behandelte Zellen sind im Balkendiagramm dargestellt. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit TRAIL und Alisertib in Kombination, der Anteil an Zellen mit reduzierter Viabilität, und damit der Anteil an geschädigten Zellen, mit über 63,37 % der Gesamtpopulation, noch deutlich höher liegt, als die von der Kombinationstherapie induzierte Apoptoserate (Abb. 19a/b).

#### 4.5 Überprüfung der Toxizität von Alisertib in Melanomzellen

Für den möglichen therapeutischen Einsatz von Alisertib in der Melanomtherapie ist die Überprüfung der Zelltoxizität von grundlegender Wichtigkeit. Hierfür wurde der Gehalt des zytosolischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Mediumüberstand behandelter Zellen, im Vergleich zu dem Mediumüberstand von mit Triton vollständig lysierter Zellen (maximaler LDH-Wert), gemessen (Abb.20).



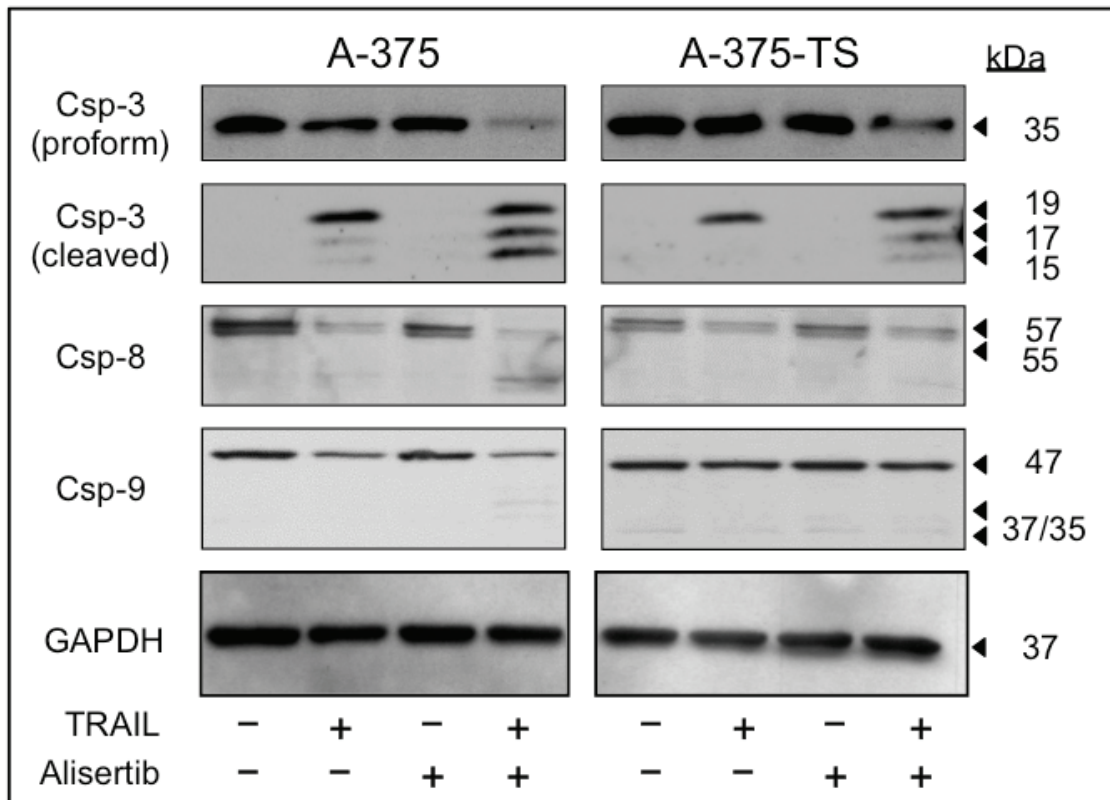
**Abbildung 20. Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Alisertib und TRAIL in A-375-, A-375-TS- und Mel-HO-Zellen** Die Zytotoxizität wurde durch Bestimmung der freigesetzten LDH-Menge gemessen. Die Zellen wurden hierzu mit 200 bzw. 500 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL inkubiert (Control unbehandelt). Es wurden jeweils Triplikate gemessen. Dafür wurde parallel zu Apoptoseexperimenten Mediumüberstand entnommen und im Vergleich zu einer mit Triton behandelten Probe die LDH-Aktivität gemessen. Die Werte sind in Relation zu Triton zu bewerten.

Es konnte in diesen Experimenten keine signifikante Zelltoxizität durch die Behandlung mit Alisertib alleine im verwendeten Konzentrationsbereich festgestellt werden. Bei der durch TRAIL induzierten Zytotoxizität, die dann ebenfalls in der Kombination mit Alisertib zusehen war, handelt es sich nur um eine scheinbare Zytotoxizität, die nur in vitro auftritt, da hier die Autophagie durch Makrophagen nicht stattfindet.

#### **4.6 Einfluss von Alisertib auf die Aktivierung der Caspasenkaskade**

Um den Mechanismus besser verstehen zu können, durch den Alisertib Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert, wurde die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -9 und der Effektorcaspase-3 mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Die für die Lysate verwendeten Zelllinien waren A-375 und A-375-TS, die mit 200 nm Alisertib und 20 ng/ml TRAIL für 16 h behandelt wurden (Abb. 21).

In den sensitiven A-375 Zellen führte die Behandlung mit TRAIL erwartungsgemäß alleine zu einer Aktivierung der Caspasenkaskade. Dies war an den auftretenden Spaltprodukten der Caspase-8 (18, 41, 43 kDa), der Caspase-9 (35, 37 kDa) und der Caspase-3 (15, 17, 20 kDa) zu sehen (Abb. 22). Die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 wurde durch die Kombinationsbehandlung weiter verstärkt, die von Caspase-9 jedoch nur andeutungsweise (Abb. 22). In den TRAIL-selektierten A-375-TS-Zellen führte die Behandlung mit TRAIL alleine zu einer moderaten Aktivierung der Caspase-8 und zu einer unvollständigen Aktivierung der Caspase-3, zu sehen an dem 19 kDa-Spaltprodukt. Wie die parentalen Zellen zeigten die A-375-TS ebenso eine moderat verstärkte Aktivierung der Caspase-8 nach Kombinationsbehandlung, die Caspase -9 wurde nicht aktiviert, allerdings konnte die Caspase-3 verstärkt aktiviert werden. Alisertib alleine führte zu keiner Aktivierung der Caspasenkaskade (Abb. 21).



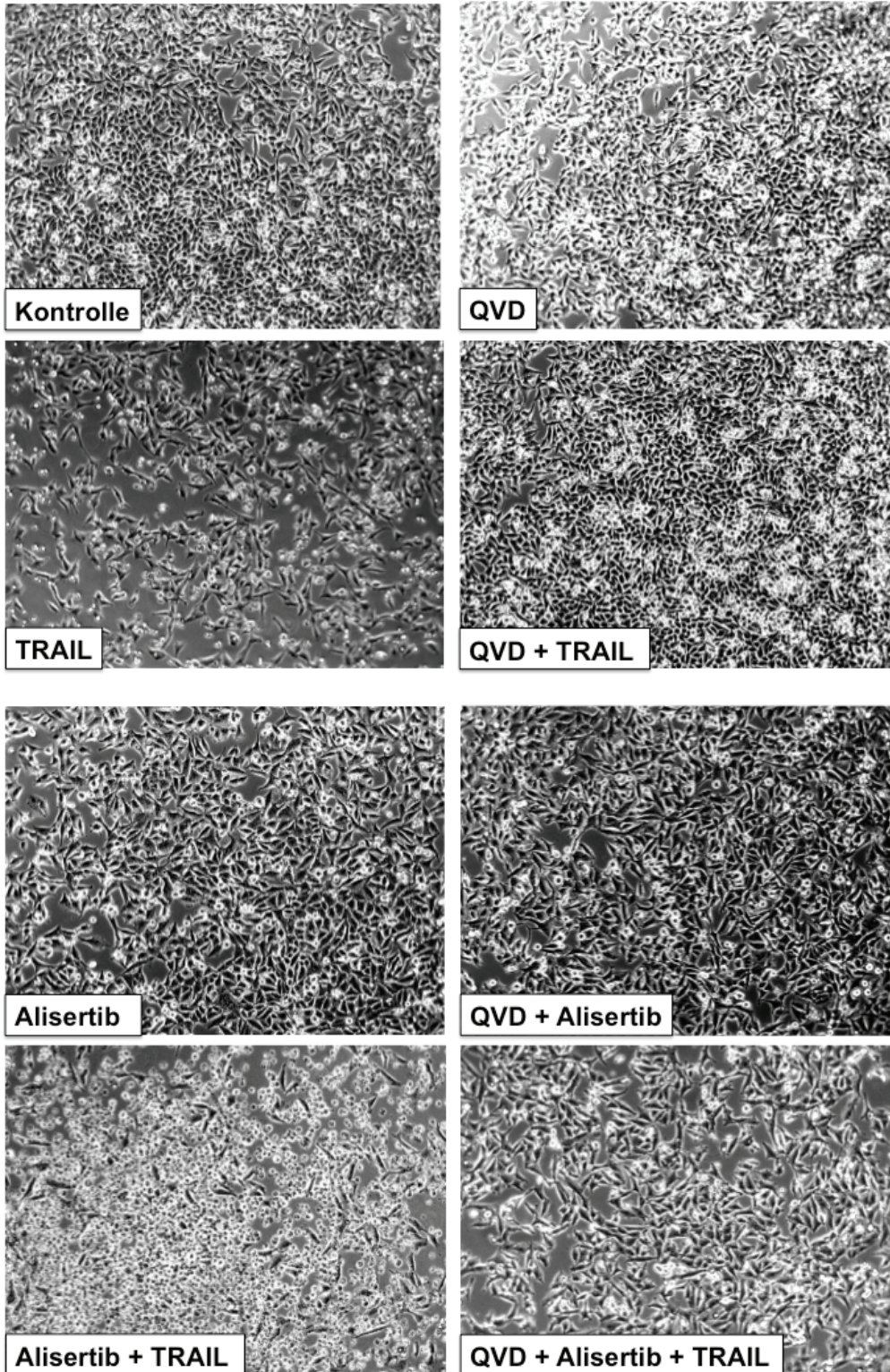
**Abbildung 21: Überprüfung der Caspasenaktivierung durch TRAIL und Alisertib auf Proteinebene in der Western-Blot-Analyse** Die Prozessierung der Caspasen-8, -9 und -3 wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse in A-375 und A-375-TS-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) +/- 20 ng/ml TRAIL für 16 h behandelt. Drei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Um die Rolle der Caspasen in der Alisertib/TRAIL-induzierten Apoptose noch weiter zu klären, wurde der Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph eingesetzt, der irreversibel an die katalytische Domäne der Caspasen bindet. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte für 1 h mit 10  $\mu$ M Q-VD-Oph und im Anschluss mit 200 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL für 24 h.

Die morphologischen Veränderungen in den A-375- und A-375-TS-Zellen, die durch die TRAIL-Behandlung induziert wurden, konnten durch eine Vorbehandlung mit Q-VD-Oph blockiert werden. Die durch die Wirkung von Alisertib induzierten morphologischen Veränderungen, zeigten sich trotz Vorbehandlung mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph. In der Kombination von TRAIL und Alisertib wurde die Wirkung von Alisertib verstärkt und die Q-VD-Oph-induzierte Blockierung der Wirkung von TRAIL überwunden (Abb. 22a/b).



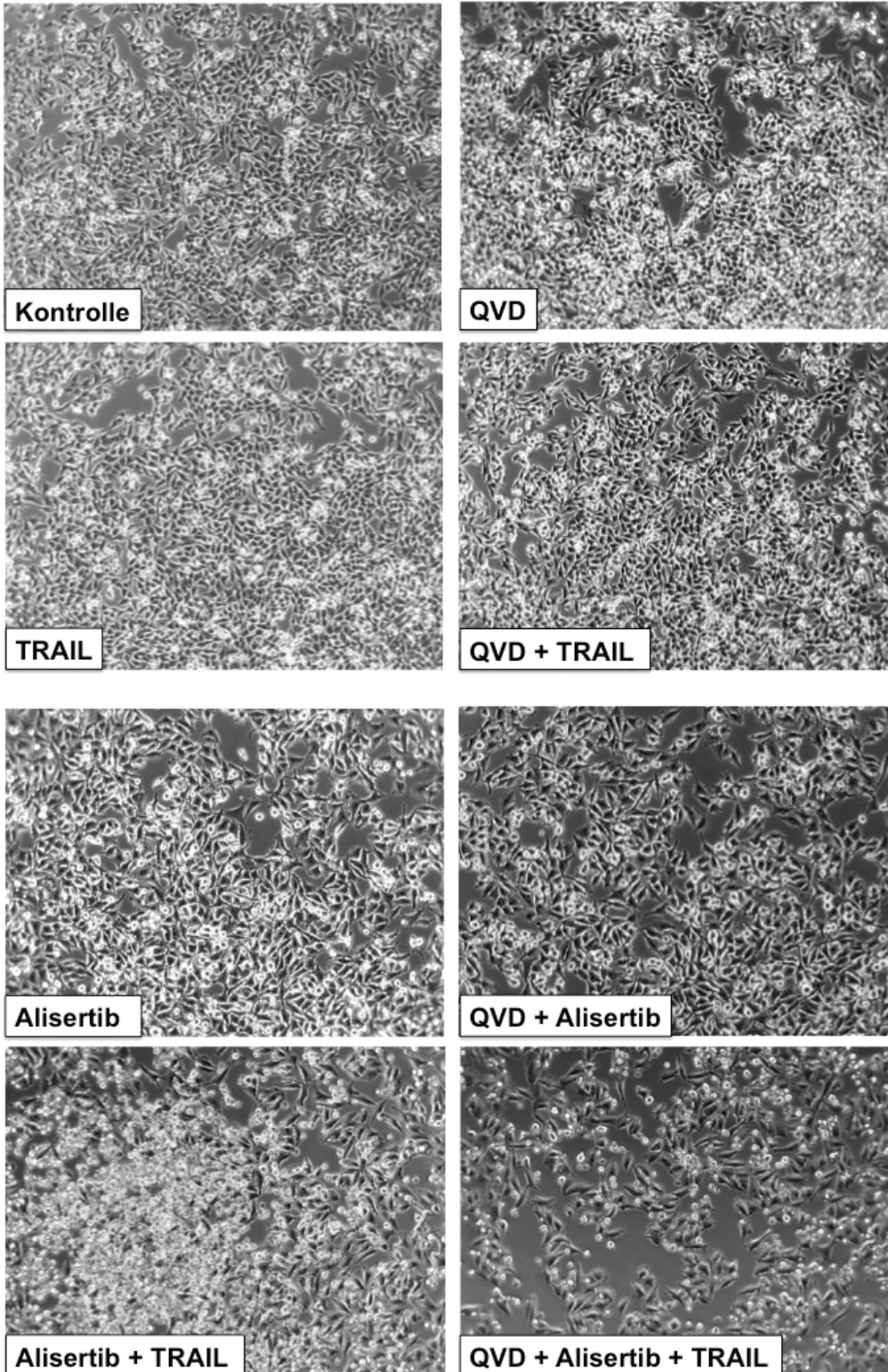
## A-375



**Abbildung 22a: Zellmorphologie von A-375-Zellen 24 h nach Behandlung mit TRAIL, Alisertib und der Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit der Caspasenaktivität** Die Zellmorphologie wurde in 100facher Vergrößerung fotografiert, nachdem die Zellen 24 h zuvor mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph behandelt wurden und anschließend mit TRAIL und Alisertib (Vorbehandlung vor TRAIL für 2 h). Die Experimente sind mindestens dreimal wiederholt wurden mit jeweils Dreifachwerten.

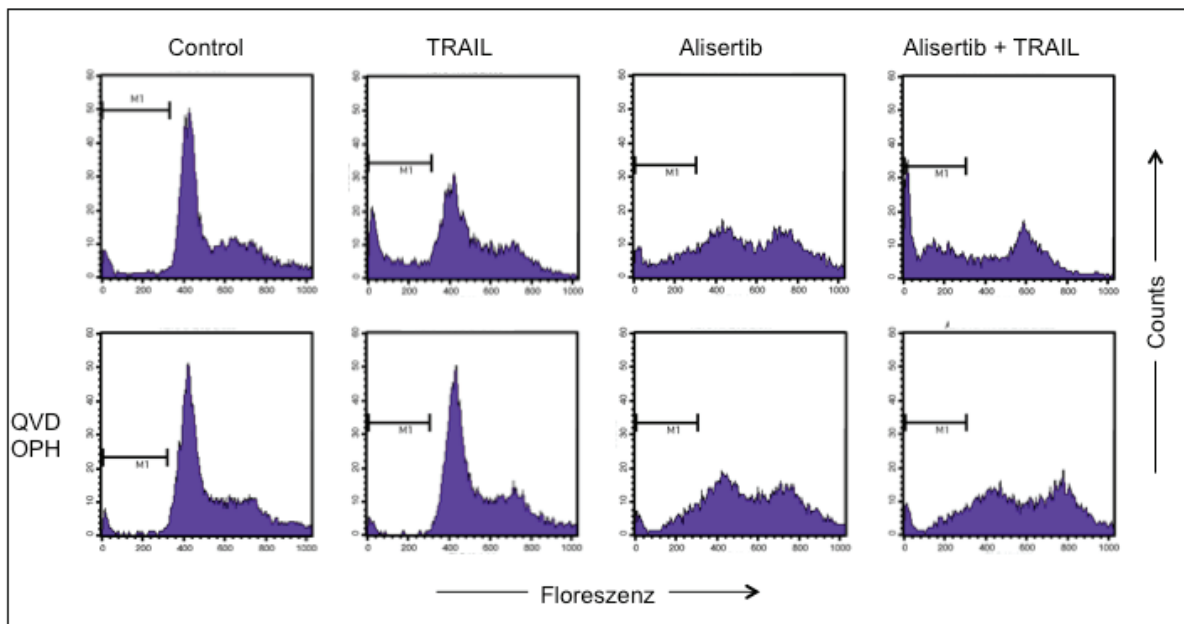


**A-375-TS**

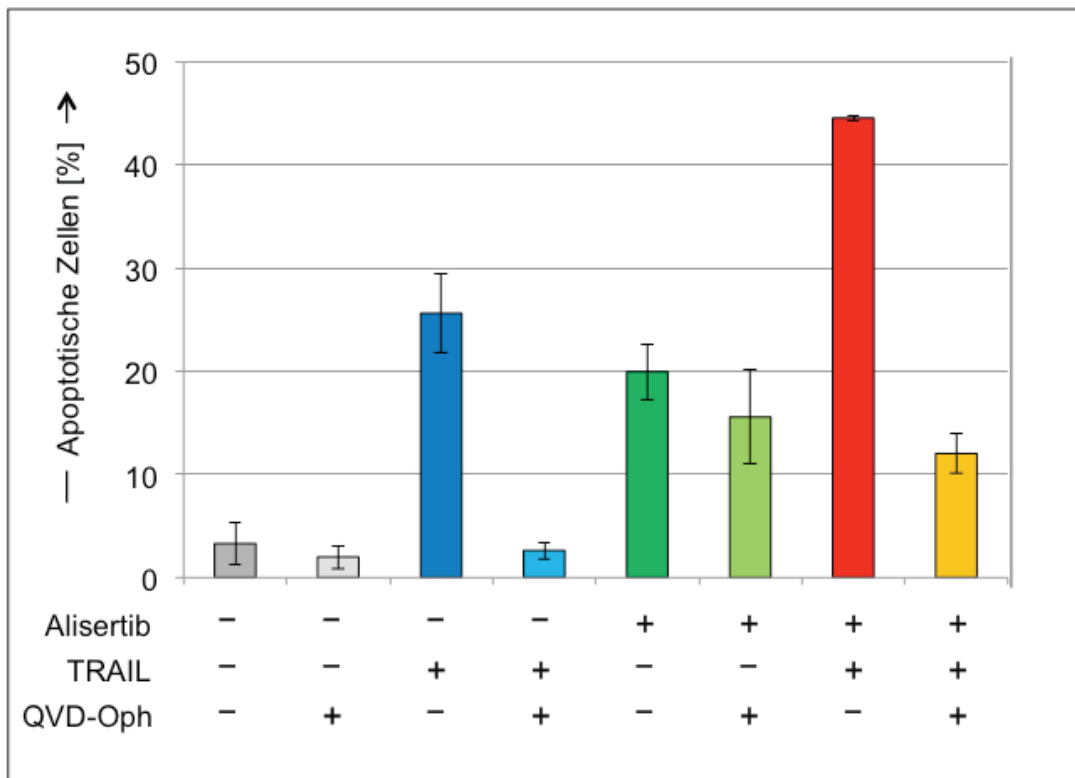


**Abbildung 22b: Zellmorphologie von A-375-TS-Zellen 24 h nach Behandlung mit TRAIL, Alisertib und der Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit der Caspasenaktivität** Die Zellmorphologie wurde in 100facher Vergrößerung fotografiert, nachdem die Zellen 24 h zuvor mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph behandelt wurden und anschließend mit TRAIL und Alisertib (Vorbehandlung vor TRAIL für 2 h). Die Experimente sind mindestens dreimal wiederholt wurden mit jeweils Dreifachwerten.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von TRAIL und Alisertib nach Caspase-Blockierung durch Q-VD-Oph auf die Zellmorphologie deuten auf eine Caspasen-unabhängige Induktion der Apoptose durch Alisertib hin. Zur Überprüfung wurden die A-375-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Eine Blockierung der TRAIL-induzierten Apoptose durch Q-VD-Oph konnte nachgewiesen werden. Die Wirkung von Alisertib wurde dagegen nur moderat blockiert. In der Kombination erzielte die Behandlung mit TRAIL und Alisertib nach Vorbehandlung mit Q-VD-Oph höhere Apoptoseraten als eine Behandlung mit TRAIL allein (Abb. 23a/b).



**Abbildung 23a:** Apoptoseinduktion und Zellzyklusveränderungen durch TRAIL und Alisertib unter Einfluss des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-Oph A-375-Zellen im Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h), 20 ng/ml TRAIL und 10  $\mu$ M QVD-Oph (2 h vorinkubiert vor Alisertib) für 24 h behandelt. Das Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt mit Dreifachwerten. Die hier gezeigten Graphen sind repräsentativ.

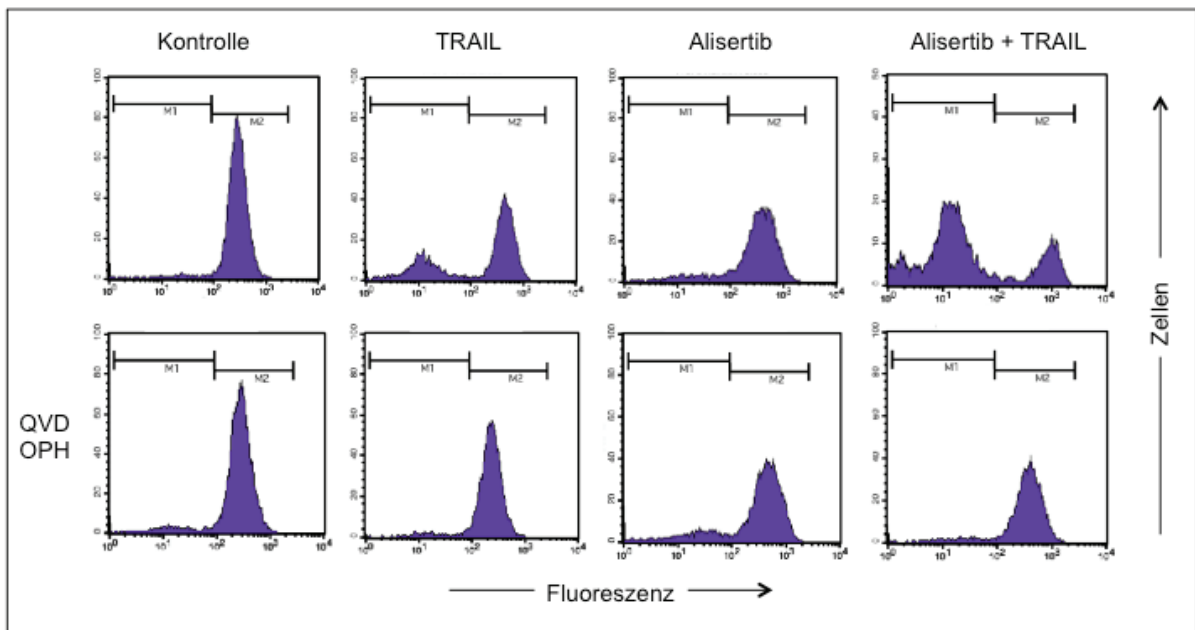


**Abbildung 23b: Apoptoseinduktion durch TRAIL und Alisertib unter Einfluss des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-Oph** A-375-Zellen im Apoptoseassay (Propidiumjodid, FACS) mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h), 20 ng/ml TRAIL und 10  $\mu$ M Q-VD-Oph (2 h vorinkubiert vor Alisertib) für 24 h behandelt. Das Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt mit Dreifachwerten. Die hier gezeigten Graphen sind repräsentativ.

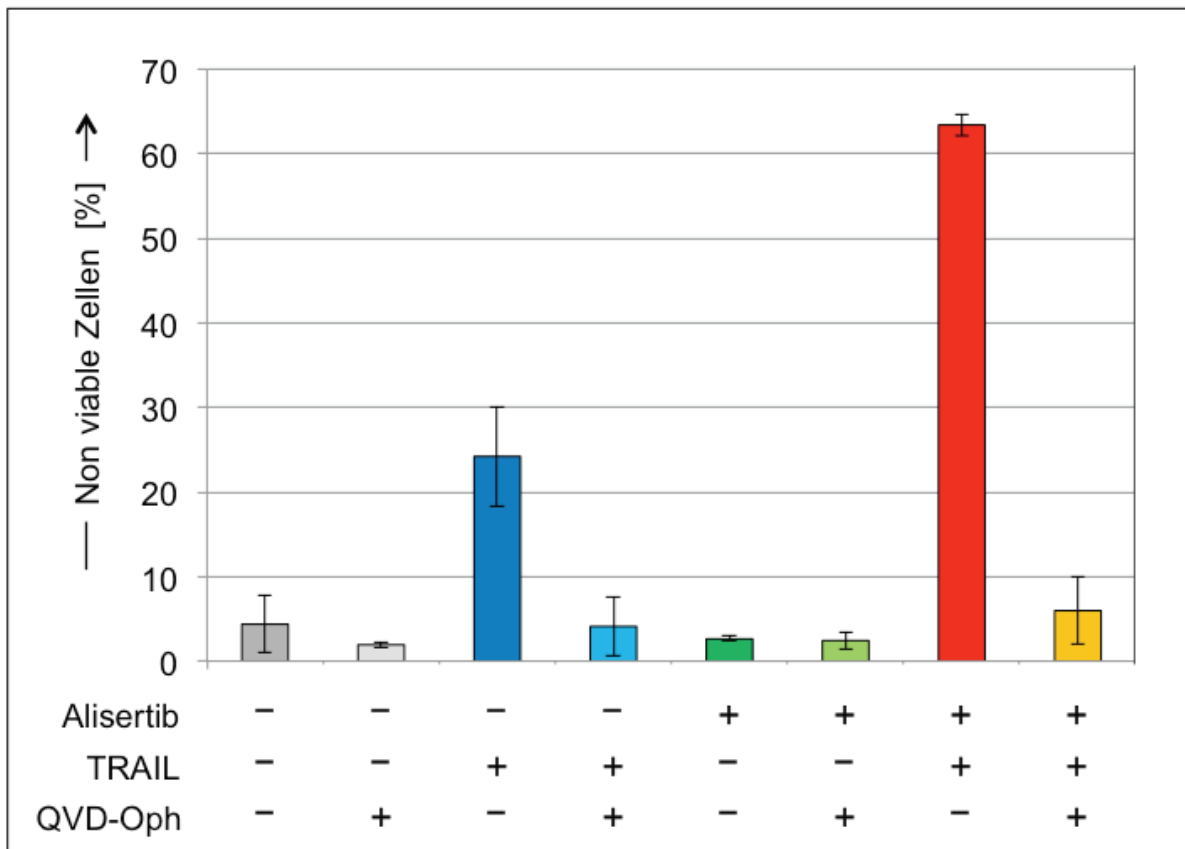
Eine Analyse der Zellviabilität nach Behandlung von A-375-Zellen mit TRAIL und Alisertib nach Vorbehandlung mit Q-VD-Oph zeigte, dass die TRAIL-Wirkung durch Q-VD-Oph blockiert wurde, die Wirkung von Alisertib dagegen kaum beeinflusst wurde. In Kombination aller drei Substanzen war die Wirkung entsprechend der Alisertib-Wirkung (Abb. 24a/b).

Die Blockierung der Caspasenkaskade führte zur vollständigen Blockierung der Caspasen-abhängigen TRAIL-Wirkung. Alisertib konnte seine Wirkung Caspasen-unabhängig entfalten und wurde durch die Inhibition der Caspasenkaskade nicht blockiert.





**Abbildung 24a: Darstellung der Zellviabilität** Messung der Zellviabilität mittels Calcein-Assay in A-375-Zellen, 24 h nach Behandlung mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und +/- 20 ng/ml TRAIL, sowie mit 10  $\mu$ M des Pan-Caspase-Inhibitors QVD-Oph (2 h vorinkubiert vor Alisertib). Behandelte Zellen sind mit violetten, geschlossenen Graphen dargestellt. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.



**Abbildung 24b: Quantitative Darstellung der Zellviabilität** Messung der Zellviabilität mittels Calcein-Assay in A-375, 24 h nach Behandlung mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und +/- 20 ng/ml TRAIL, sowie 10.  $\mu$ M Q-VD-Oph. Behandelte Zellen sind im Balkendiagramm dargestellt. Der prozentuale Anteil an nicht vitalen Zellen nimmt in der Kombinationsbehandlung mit Alisertib und TRAIL signifikant zu. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

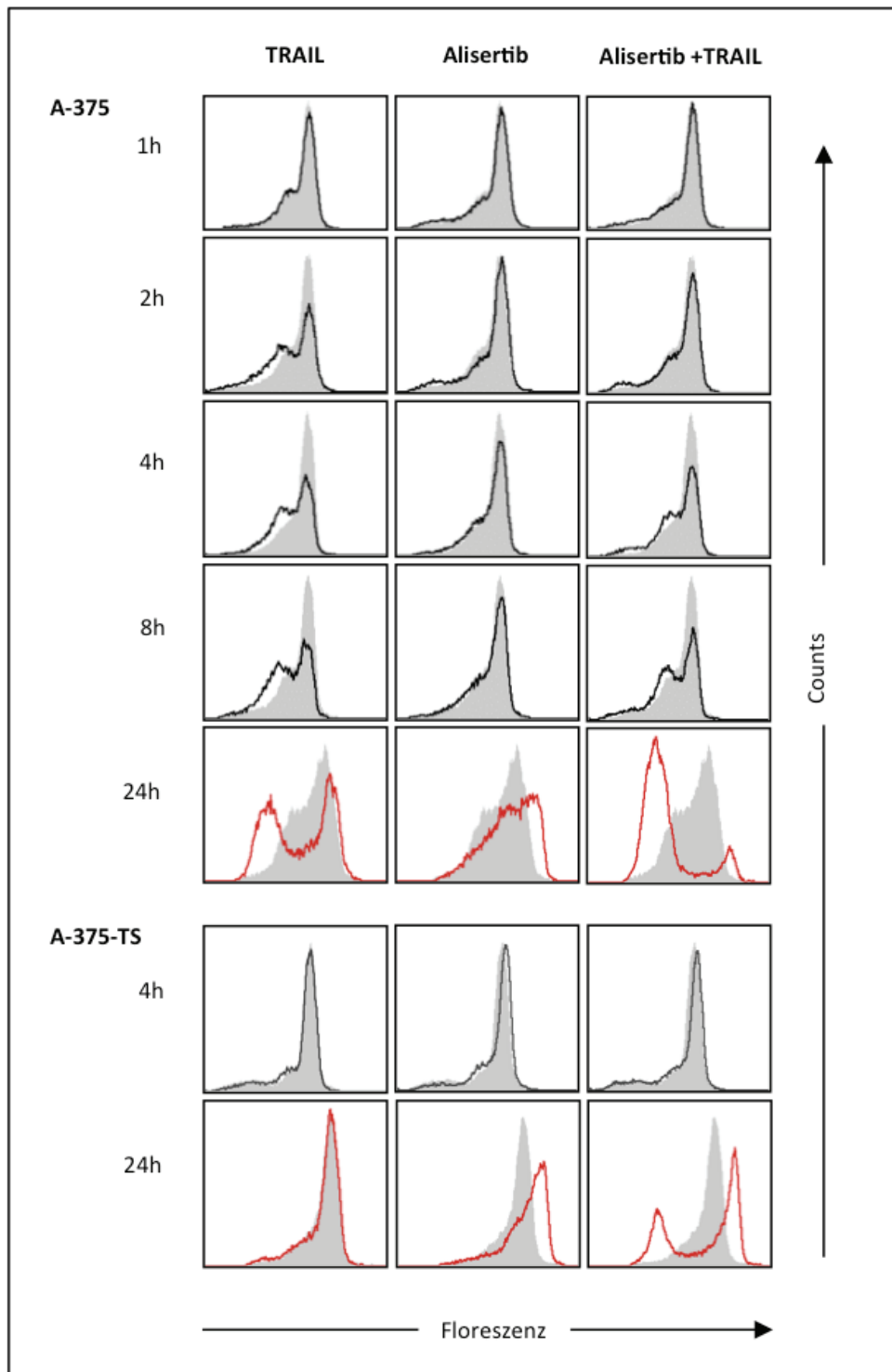
Durch die Vorbehandlung mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph konnte die Wirkung von TRAIL in den A-375-Zellen vollständig blockiert werden. Die Kombination von Q-VD-Oph mit Alisertib führte nicht zu einer Blockierung der Wirkung von Alisertib (Abb. 22, 23a/b, 24a/b).

#### 4.7 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges

Die Ergebnisse der Untersuchung des extrinsischen Apoptose-Signalweges deuten auf eine Caspasen-unabhängige Wirkung von Alisertib hin. Um die Beteiligung des mitochondrialen Apoptosesignalweges zu untersuchen, wurde das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) gemessen. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren (Cytochrom C, AIF, SMAC) in das Zytoplasma und ist

ein irreversibler Schritt des intrinsischen Apoptose-Signalweges (Gonzalves und Ashkenazi, 2010, Tait und Green, 2010). Die verwendeten Zelllinien A-375 und A-375-TS wurden mit 200 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL behandelt und nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h wurde das Membranpotential gemessen (Abb. 25).

A-375 Zellen zeigten nach Behandlung mit TRAIL einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Dieser Effekt setzte bereits nach 4 h ein. Alisertib zeigte nach 4 h hingegen keinen Effekt auf der Ebene des Membranpotentials. Nach 24 h zeigte sich eine deutliche Hyperpolarisation an den Mitochondrienmembranen. Die Kombination von Alisertib und TRAIL führte zu einem massiven Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nach 24 h. In den A-375-TS-Zellen konnte erwartungsgemäß kein Effekt von TRAIL nachgewiesen werden. Alisertib führte allerdings auch in diesen Zellen zu einer deutlichen Hyperpolarisation an der Mitochondrienmembran. In der Kombination mit TRAIL und Alisertib kam es zu einem deutlichen Verlust des Membranpotentials, allerdings konnte auch weiterhin eine Hyperpolarisation bei einem Teil der Zellpopulation nachgewiesen werden.

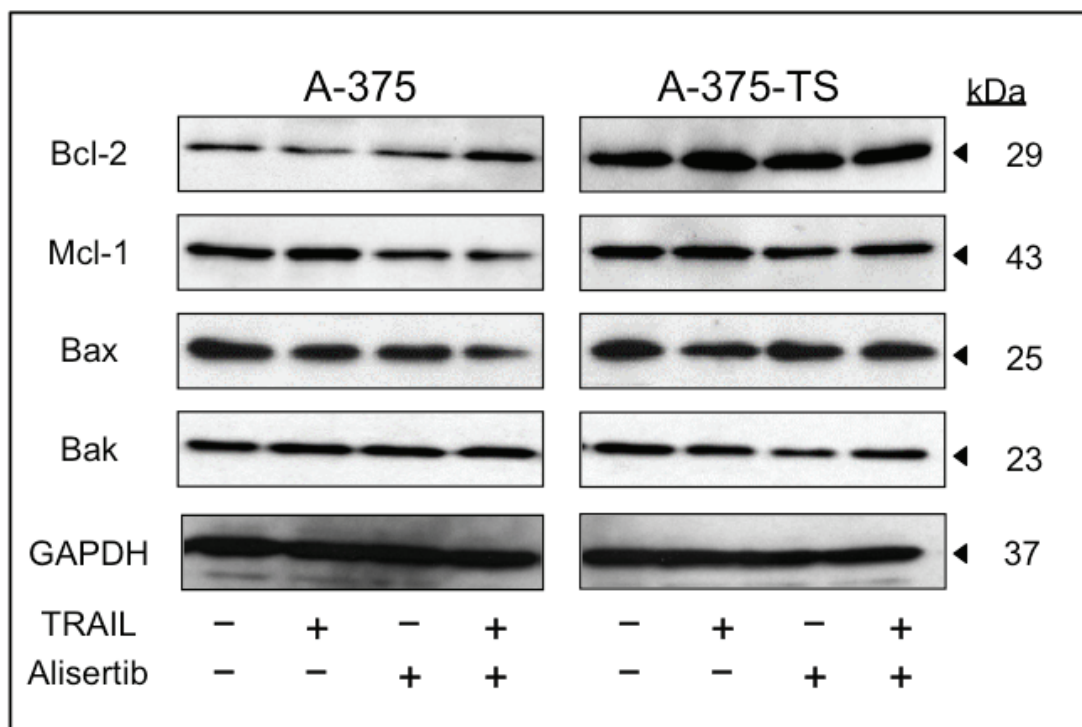


**Abbildung 25: Veränderungen am mitochondrialen Membranpotential nach Behandlung mit TRAIL und Alisertib.** Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) in A-375, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h und in A-375-TS 4 h und 24 h nach Behandlung mit 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) und +/- 20 ng/ml TRAIL. Behandelte Zellen (offene Graphen, bei den A-375-TS rot dargestellt) werden mit DMSO-behandelten Zellen (graue, geschlossene Graphen) verglichen. Drei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Alisertib zu keinem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führte. In der Kombination mit TRAIL verstärkte es die Wirkung von TRAIL und war in der Lage TS-Zellen für TRAIL zu sensitivieren.

#### 4.8 Einfluss von Alisertib auf die Expression von Bcl-2 Proteinen

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteine regulieren die Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalweges (Green und Kroemer, 2004). Um den Einfluss von Alisertib auf die Proteinexpression der Bcl-2-Proteine zu überprüfen, wurden die Zelllinien A-375 und A-375-TS mit 200 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL für 24 h behandelt und anschließend im Westernblot analysiert (Abb. 26).



**Abbildung 26: Expression von Bcl-2-Proteinen nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL** Die Expression der Bcl-2 Proteine wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse in A-375- und A-375-TS-Zellen untersucht. Die Behandlung erfolgte mit 20 ng/ml TRAIL, 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) oder der Kombinationen für 24 h. Drei voneinander unabhängige Experimente wurden durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

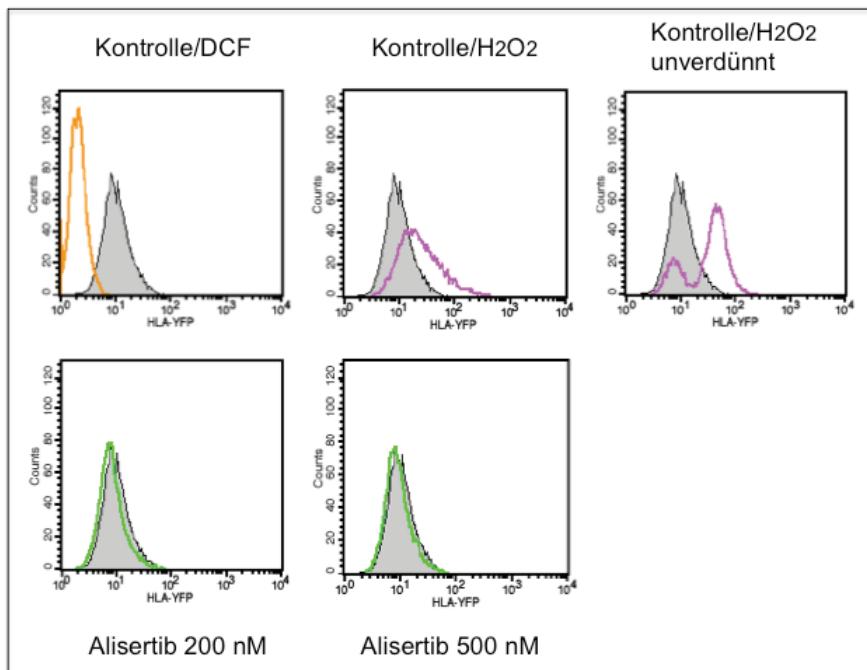
Die Expression der untersuchten Bcl-2-Proteine Bcl-2, Mcl-1, Bax und Bak wurde untersucht. Es zeigte sich kein Einfluss von Alisertib auf die Expression der überprüften Bcl-2-Proteine.

### **4.9 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach Behandlung mit Alisertib**

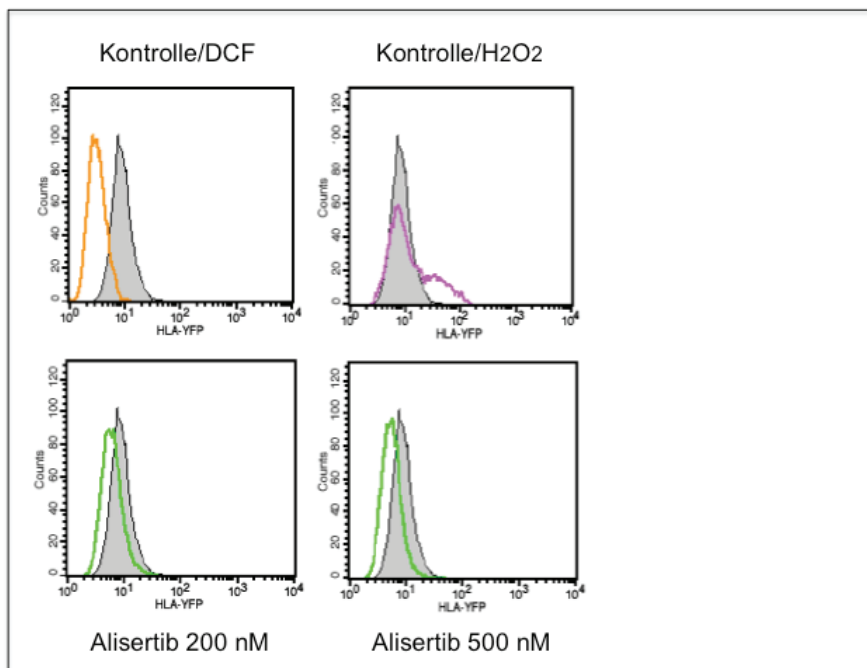
Unter physiologischen Bedingungen sind moderate ROS-Spiegel Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen und wirken als sekundäre Botenstoffe bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF-kappa-B und p53. Erhöhte ROS-Spiegel führen zu Schäden an der Mitochondrienmembran, an Proteinen, der DNS und führen schließlich zur Apoptose oder Nekrose.

Zur Überprüfung der Wirkung von Alisertib auf die ROS-Bildung wurden die Zelllinien A-375 und A-375-TS mit 200 nM und 500 nM Alisertib und 20 ng/ml TRAIL behandelt. Parallel wurden ROS-Spiegel im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Kontrollen (unverdünnt und verdünnt) und einer nur mit Farbstoff-behandelten Kontrolle (H<sub>2</sub>DCFDA) zu 30 min, 1 h, 2 h, 4 h bestimmt (Abb. 27a/b, 28).

## A-375 -30 min



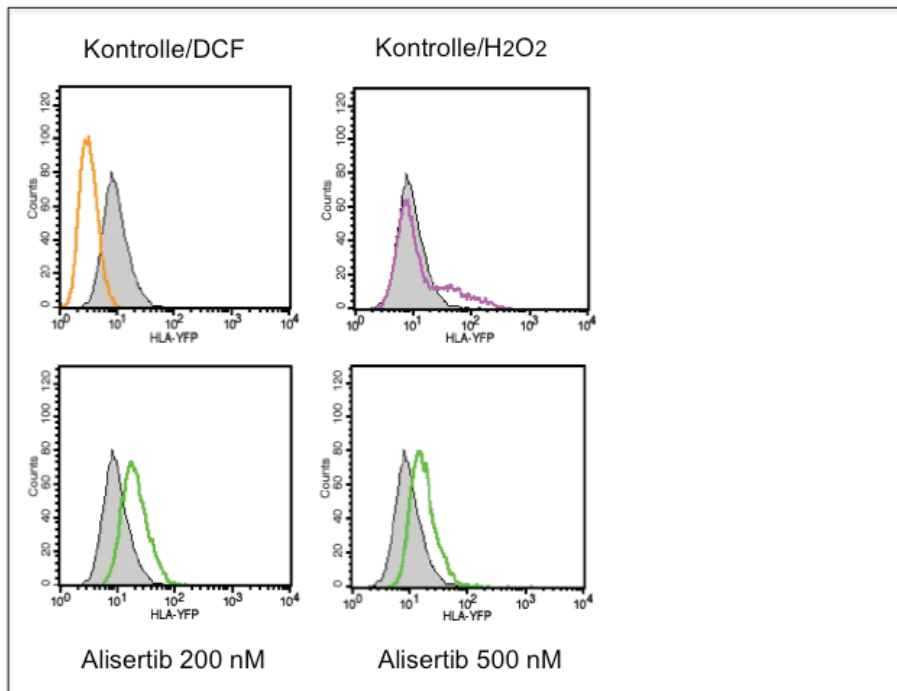
## A-375 – 1 h



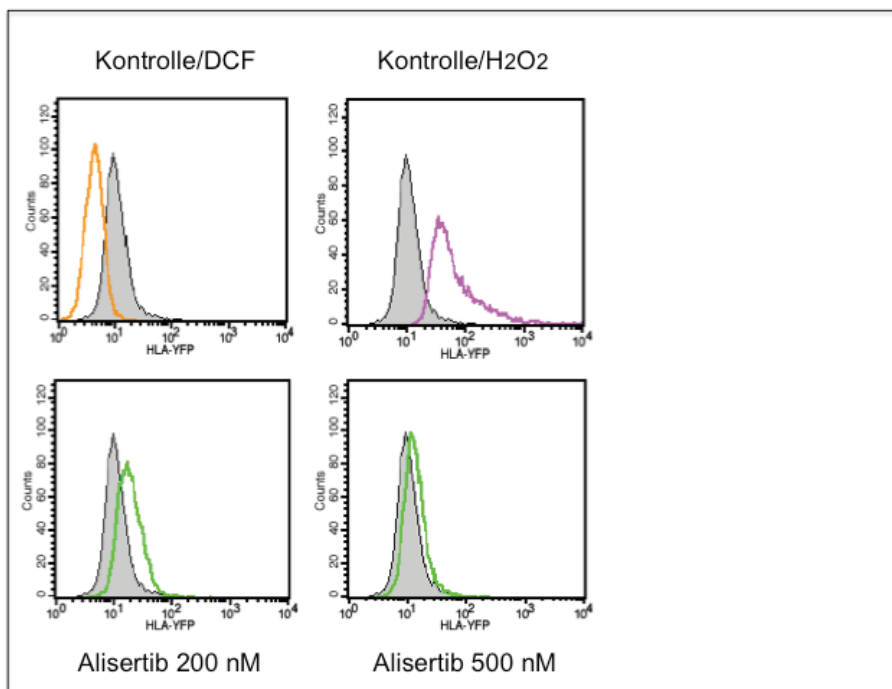
**Abbildung 27a: Bestimmung der ROS-Spiegel nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL A-375**  
 Zellen wurden für 30 min bzw. 1 h mit 200 und 500 nM Alisertib behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Behandelte Zellen (offene farbige Graphen) wurden mit DMSO-behandelten Kontrollen (graue, gefüllte Graphen) verglichen. Eine höhere Fluoreszenz (Shift nach rechts) korrespondiert mit erhöhten ROS-Spiegeln. Es wurden drei unabhängige Experimente, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse waren vergleichbar. Die Graphen zeigen repräsentativ ausgewählte Proben eines Experiments.



**A-375 – 2 h**

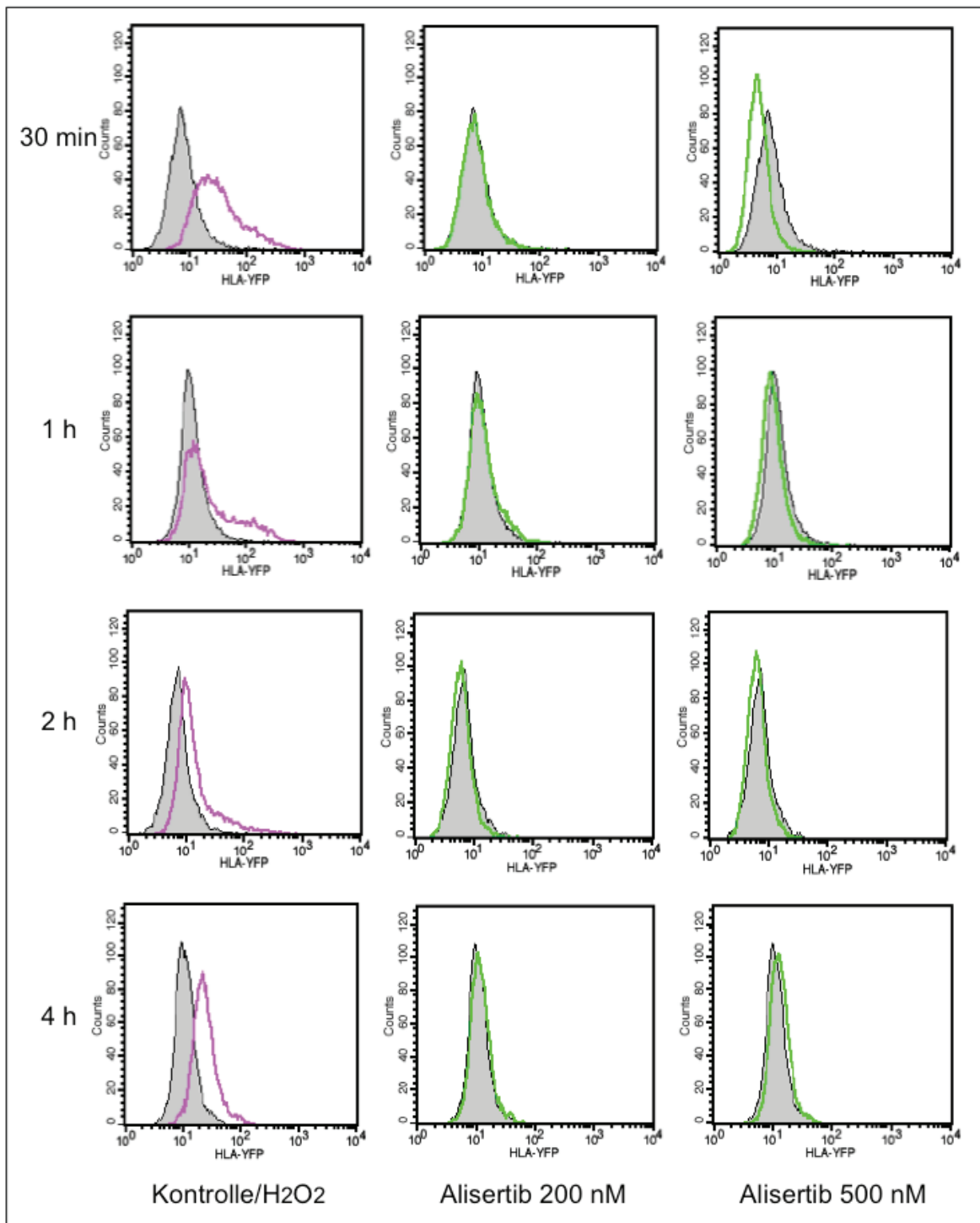


**A-375 – 4 h**



**Abbildung 27b: Bestimmung von ROS in A-375-Zellen** A-375-Zellen wurden für 30 min, 1 h, 2 h und 4 h mit 200 und 500 nM Alisertib behandelt, anschließend mit H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Behandelte Zellen (farbige Graphen) wurden mit DMSO-Kontrollen (grau gefüllte Graphen) verglichen. Ein Shift nach rechts korrespondiert mit erhöhten ROS-Spiegeln. Drei unabhängige Experimente, mit jeweils Triplikaten zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Graphen zeigen repräsentativ ausgewählte Proben eines Experiments.

## A-375-TS



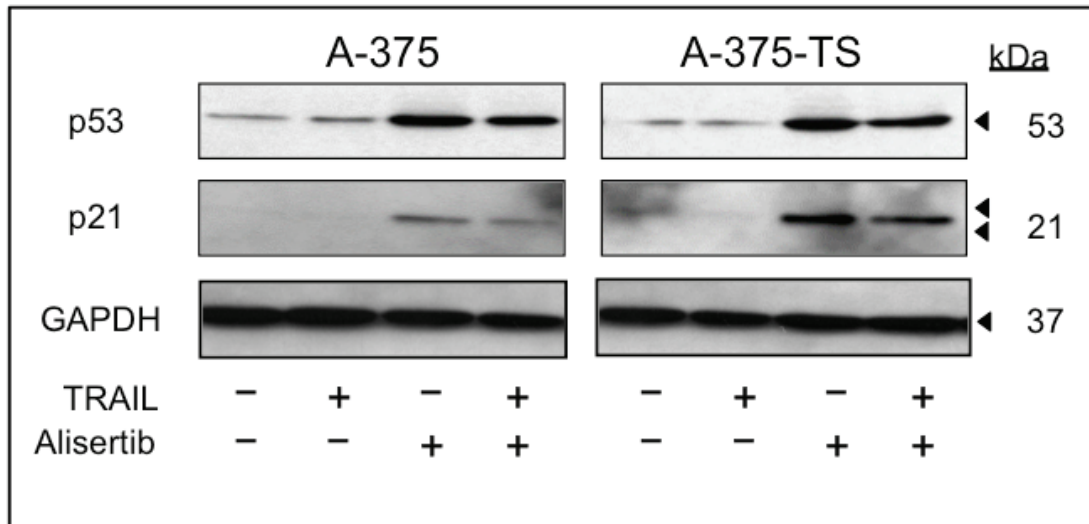
**Abbildung 28: Bestimmung von ROS in A-375-TS** A-375-TS-Zellen wurden für 30 min, 1 h, 2 h und 4 h mit 200 und 500 nM Alisertib behandelt, anschließend mit H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Behandelte Zellen (farbige Graphen) wurden mit DMSO-Kontrollen (grau gefüllte Graphen) verglichen. Ein Shift nach rechts korrespondiert mit erhöhten ROS-Spiegeln. Drei unabhängige Experimente, mit jeweils Triplikaten zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Graphen zeigen repräsentativ ausgewählte Proben eines Experiments.

In den A-375-Zellen kam es zu keiner reproduzierbaren Erhöhung der ROS-Spiegel. Es konnte keine Erhöhung der ROS-Spiegel in A-375-TS-Zellen durch die Behandlung mit Alisertib im Vergleich zu den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Kontrollen festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Mechanismus nicht für die Alisertib-Wirkung verantwortlich ist.

### **4.10 Aktivierung von p53 und p21 durch Alisertib**

Als Schlüsselprotein in der Zellzykluskontrolle und Apoptose kommt p53 eine besondere Rolle als Tumorsuppressor zu. Es induziert als Transkriptionsfaktor die Produktion des Proteins p21, das wiederum hemmt sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex und unterbricht damit die Fortführung des Zellzyklus. Die Zellen bekommen durch die Aktivierung von p53 Zeit, DNA zu reparieren, bevor sie sich teilen. Ist die Reparatur möglich, sinkt der p53-Spiegel wieder, p21 wird nicht weiter transkribiert und der Zellzyklus kann fortgeführt werden. Ist eine Reparatur nicht möglich, werden durch p53 die proapoptischen Bcl-2-Proteine aktiviert und so die Caspasenkaskade eingeleitet, die zur Apoptose führt. Zur weiteren Abklärung des möglichen Mechanismus der durch Alisertib vermittelten TRAIL-Sensitivierung wurden p53 und p21 genauer untersucht.

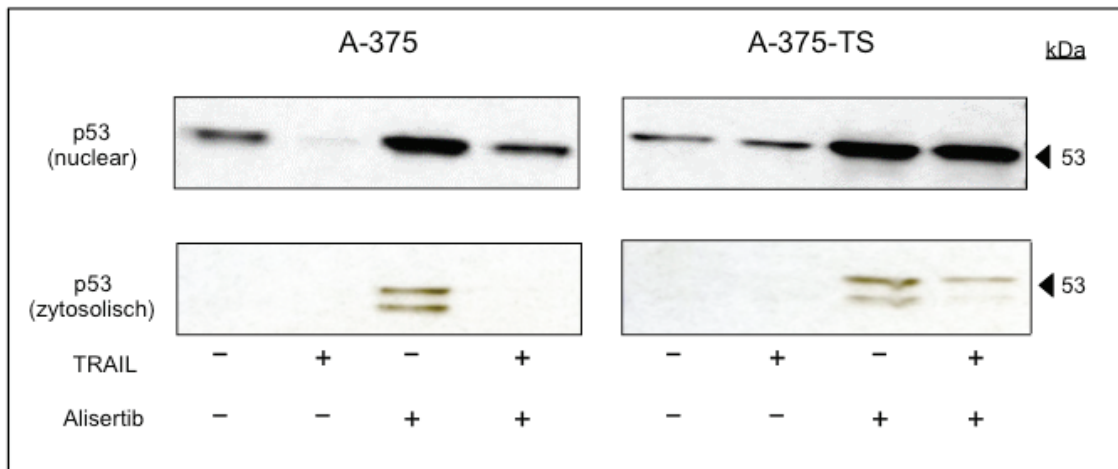
Die Wirkung einer Behandlung mit Alisertib auf die Aktivierung von p53 und p21 wurde auf Proteinebene in den Zelllinien A-375 und A-375-TS im Western-Blot in Gesamtzellextrakten untersucht. Es kam durch TRAIL zu keiner Aktivierung von p53 in diesen Zelllinien.



**Abbildung 29: Expression von p53 und p21 auf Proteinebene im Gesamtzellextrakt von A-375- und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL** Die Expression von p53 und p21 wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse in A-375-Zellen und A-375-TS-Zellen untersucht. Die Behandlung erfolgte mit 20 ng/ml TRAIL, 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) oder der Kombinationen Drei voneinander unabhängige Experimente wurden durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Behandlung mit Alisertib rief eine signifikante Hochregulierung von p53 hervor. In der Kombination mit TRAIL erschien diese Wirkung eher abgemildert. Für die Proteine p53 und p21 ist beschrieben, dass sie durch die Behandlung mit TRAIL nicht aktiviert werden (Fecker et al., 2006). Das Protein p21 wird ebenfalls durch Alisertib aktiviert (Abb. 29).

Um diesen Vorgang in den Zellen genauer lokalisieren zu können, wurden Kern- und Zytosolextrakte erstellt und vergleichend untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass p53 im Kern hochreguliert ist. Dabei ist auffällig, dass die Wirkung in der Kombinationsbehandlung mit TRAIL im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Alisertib in A-375-Zellen abgeschwächt ist. In den A-375-TS-Zellen, in denen von TRAIL keine Effekte ausgingen, ist die Aktivierung von p53 durch die Kombination mit TRAIL genauso stark wie durch Alisertib alleine. (Abb. 30).



**Abbildung 30: Die zytosolische und nukleäre Expression von p53 in A-375- und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL** Die Expression und Lokalisation von p53 wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse in A-375 und A-375-TS untersucht. Dafür wurden Kern und Zytosolextrakte hergestellt. Die Behandlung erfolgte mit 20 ng/ml TRAIL, 200 nM Alisertib (Vorbehandlung für 2 h) oder der Kombinationen. Zwei voneinander unabhängige Experimente wurden durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse zeigen, dass p53 im Kern durch Alisertib hochreguliert wurde. Dabei war auffällig, dass die Wirkung in der Kombinationsbehandlung mit TRAIL im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Alisertib in A-375-Zellen abgeschwächt war. In den A-375-TS-Zellen, in denen von TRAIL keine Effekte ausgingen, war die Aktivierung von p53 durch die Kombination mit TRAIL genauso stark wie durch Alisertib alleine (Abb. 30).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durchgeführten Untersuchungen erstmalig zeigen, dass Alisertib Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren. Dabei vermittelt Alisertib seine Wirkung nicht über die Caspasenkaskade, das mitochondriale Membranpotential oder eine Beeinflussung der Bcl-2-Protein-Expression, sondern führt zu einer Aktivierung von p53.

## 5. Diskussion

---

### 5.1 Bedeutung von Zellkulturmodellen im Melanom

Beim Melanom handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die aus Melanozyten entstehen. Kutane Melanome können dabei grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen in solche, die durch chronische Schädigung durch UV-Strahlung entstehen und zum anderen in solche, die nicht durch UV-Schädigung entstehen. Melanome UV-geschädigter Haut treten typischerweise an Kopf, Schulter und Nacken und den dorsalen Seiten der Arme auf (Bastian, 2014). Modelle, die die Progression eines benignen Nävus als gerichtet über die maligne Entartung, den invasiven Wachstum eines Melanoms bis zur Metastasierung beschreiben (siehe Abb.1 Clark Stadien), werden nach heutiger Sicht der Komplexität der Entstehung eines Melanoms nicht immer gerecht (Shain und Bastian, 2016).

Diese Komplexität lässt sich durch die Funktion und Anatomie der Melanozyten erklären. In der Epidermis eines Menschen finden sich ca. 1500 dieser Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Sie bilden eine kleine Zellpopulation, die sich unregelmäßig und sehr selten teilt (Kanitakis, 2002). Proliferation und Funktion werden durch die UV-Strahlung stimuliert. DNS-Schädigung in den Keratinozyten, die das Hormon alpha-MSH (alpha Melanocyte Stimulating Hormone) ausscheiden, regen die Melanozyten zur Melanin-Produktion an. Dies geschieht als Schutzmechanismus vor weiterer, Sonnen-induzierter DNS-Schädigung (Kaidbey et al., 1979).

Da Melanozyten aus der Neuralleiste stammen, erklärt sich ihre dendritische Morphologie und ihr teilweise nicht nur auf die Haut begrenztes Vorkommen. Melanome, die von uvealen, anogenitalen oder meningealen Melanozyten ausgehen, unterscheiden sich histopathologisch und genetisch stark von kutanen Melanomen (Bastian, 2014). Das die Gewebeumgebung und die für die Melanomart typischen Mutationen Einfluß auf die Funktion und die Reaktion der Zellen auf verschiedene Stimuli haben, konnte bereits experimentell nachgewiesen werden (Huang et al., 2015).

Grundsätzlich sind Zellkulturmodelle beim Melanom sowohl von primären Melanomen oder Melanommetastasen nur eingeschränkt auf die *in vivo*-Situation übertragbar, da den Zellen die physiologische Umgebung fehlt und die Zellkulturlinien durch wiederholte Passagen beeinflusst werden. Metastasenzellen, die *in vivo* zu den am schnellsten proliferierenden Zellen gehören (Straume et al., 2000), können *in vitro* sogar den gegenläufigen Effekt haben, wie es sich auch in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigen ließ. Es gibt Hinweise das selbst die Isolation von Melanozyten aus unterschiedlichen Bereichen des Körpers unterschiedliche Phänotypen und Expressionsmustern ergeben, mit einer unterschiedlichen

Bereitschaft Melanome zu entwickeln (Huang et al., 2015). Der Vergleich von Melanomzellkulturen mit primären, kultivierten Melanozyten ist deswegen problematisch, da Melanozyten in der Zellkultur nur durch den Einsatz von stimulierenden Zusätzen kultivierbar sind. Dieses artifizielle invitro System spiegelt nicht die invivo Situation wider.

Vor diesem Hintergrund haben solche Zellkulturmodelle aufgrund ihrer Standardisierbarkeit dennoch ihre Berechtigung um grundlegende zelluläre Mechanismen zu untersuchen. Schließlich sollten die in diesen Zellkulturen gefundenen biologischen Vorgänge in weiterführenden Experimenten, beispielsweise in Xenografts, überprüft werden. Allerdings eignen sich Zellkulturmodelle zur Identifizierung neuer Diagnostikverfahren und Therapiestrategien.

## **5.2 Die Bedeutung von Aurorakinase-Inhibitoren und TRAIL in der Tumorthherapie und Effekte von Alisertib MLN 8237 in Melanomzellen**

Die Fähigkeit von Tumorzellen zelluläre Kontrollpunkte der Proliferationsregulation zu umgehen und durch die Modulation der Apoptose eine schnell einsetzende Resistenz gegenüber der körpereigenen Tumorabwehr sowie gegenüber Tumorthérapeutika zu erzeugen, haben diese Signalwege zu Zielstrukturen innovativer Therapiestrategien gemacht. So haben die Forschungsergebnisse zur Proliferationsregulation beim Melanom über den MAP (Mitogen-activated Proteinkinasen)-Signalweg zu der Entwicklung verschiedener RAF-Kinase-Inhibitoren (z.B. Sorafenib, Dabrafenib, Vemurafenib) geführt, die in der Klinik zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom erfolgreich eingesetzt werden (Mandal et al., 2015). Der BRAF-Inhibitor Vemurafenib (Zelboraf<sup>®</sup>) ist seit 2012 in Europa zur Behandlung von Patienten mit inoperablen oder metastasiertem Melanom und einer BRAF-V600-Mutation zugelassen (Soseman et al., 2012).

Bei den Signalwegen der Apoptoseregulation konnte das therapeutische Potential von TRAIL in der Vergangenheit mehrfach dargestellt werden. Ein Therapieeinsatz wird aber durch das Einsetzen von Resistenzmechanismen limitiert (Quast et al., 2014; Lemke et al., 2014; Amarante-Mendes und Griffith, 2015). Dies führte zu mehreren Arbeiten über mögliche Kombinationsbehandlungen mit TRAIL (Berger et al. 2013; Quast et al. 2013; Zhou et al., 2013), bei denen unter anderem Zellzyklusinhibitoren zu einer Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose führten. Der Resistenzentwicklung gegen die TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzellen liegen die Hochregulierung von Bcl-2 und cIAPs, die Blockierung der Bax-Aktivierung, die Herunterregulation von Todesrezeptoren und die Herunterregulation der Initiatorcaspasen 8 und 10 (Kurbanov et al., 2007, Eberle et al., 2007; Quast et al., 2014, Trivedi und Mishra, 2015) zugrunde. Zur Überwindung dieser Resistenz wurden aus diesen



identifizierten Mechanismen verschiedene Zielstrukturen für neue Ansätze in der Melanomtherapie entwickelt, wie beispielsweise die Blockierung von IAPs durch SMAC-Mimetika (Fulda und Vucic, 2012).

Aurorakinase-Inhibitoren sind in den letzten Jahren ebenfalls in den Fokus der Tumorforschung gerückt. Ihre Zielstrukturen, die Aurorakinasen, sind essentiell für die Regulation des Zellzyklus und somit für die Zellproliferation. Aurorakinase A (AURKA) wird durch Phosphorylierung aktiviert und ist während des Überganges von der G2-Phase zur M-Phase aktiv. Sie ist an der Bildung des Spindelapparates während der Mitose beteiligt (Andrews et al., 2003, Hirota et al., 2003, Vader et al., 2008). Prinzipiell ist die Aurorakinase A auch in normalen Körperzellen exprimiert, eine Überexpression wurde allerdings besonders in malignen Zellen beschrieben (Gritsko et al., 2003, Jeng et al., 2004).

Der verwendete Inhibitor Alisertib ist selektiv gegen AURKA gerichtet und wurde bereits in Phase-II Studien bei Patienten mit fortgeschrittener myeloischer Leukämie und Non-Hodgkin's Lymphom eingesetzt. Hier zeigte Alisertib generell eine gute Verträglichkeit (Goldberg et al., 2010, Friedberg et al., 2014). Eine Tumorstillstand-hemmende Wirkung von Alisertib auf DNA-Schäden-vermittelte Seneszenz und die Blockierung von NFkappaB wurde bereits beschrieben (Lui et al., 2013). Eine Kombinationstherapie mit Alisertib wird als vielversprechende Strategie in verschiedenen Tumorentitäten gesehen (Niu et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Expression der AURKA in den verwendeten Melanomzelllinien nachgewiesen werden. Die von einem Primärtumor abstammenden Zelllinien A-375 und A-375-TS, die eine auf TRAIL-Resistenz selektierte Tochterzelllinie von A-375 ist, zeigten dabei eine im Vergleich zu den zwei von Metastasen abstammenden Zelllinien, Mel-2a und Me-Wo, eine geringer ausgeprägte Expression. Eine vergleichbare Expressionsstärke zu Mel-2a und Me-Wo, zeigte Mel-HO.

Im Rahmen eines anderen Projektes, bei dem die Proteinexpression mittels Western-Blot bestimmt wurde, wurden bereits Zellen des kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL) auf die Aurorakinase A-Basisexpression untersucht. Hier konnten wir für die CTCL-Zelllinien MyLa, SeAx, HH und HuT-78 eine Überexpression von Aurorakinase A nachweisen. Die Überprüfung erfolgte zusätzlich zur Untersuchung der Expression auf Proteinebene, auch auf RNA-Ebene mittels Reverse-Transkriptase-PCR. Zum Vergleich zeigten CD<sup>4</sup>-Gedächtniszellen eine deutlich geringere Aurorakinase A-Expression als die CTCL-Zelllinien (Humme et al., 2015). Im Melanom wird oft der Vergleich zu Melanozyten herangezogen. Dabei muss beachtet werden, dass Melanozyten Zellen sind, die unter physiologischen Bedingungen in vivo nur etwa 1 % der Zellen der Epidermis ausmachen (Brenner und Berking, 2010) und nur gering proliferieren. In einem Zellkulturmodell müssen sie stark

stimuliert werden, um eine gewünschte Proliferationsrate und Zelldichte zu erreichen. Daher ist die Vergleichbarkeit von Melanozyten und Melanomzellen im Zellkulturmodell unzureichend (Quast et al., 2014). Zusätzlich zu den Melanomzelllinien wurde daher zum Vergleich die kutane T-Zell-Lymphomzelllinie (CTCL) HuT-78 untersucht. Hier zeigten Mel-2a, Me-Wo und Mel-HO eine vergleichbare Expressionstärke von AURKA wie HuT-78 (Humme et al., 2015).

Die Hypothese, dass Aurorakinase A besonders in schnell proliferierenden, entarteten Zellen überexprimiert ist, konnte durch aktuelle Arbeiten untermauert werden (Humme et al., 2015, Sun et al., 2015) und ist ein interessanter Aspekt in Bezug auf die Verträglichkeit einer auf diese Überexpression abzielende Behandlung. Um die Effekte einer Alisertib-Behandlung in Melanomzellen bewerten zu können, wurden anschließend Proliferationsexperimente durchgeführt.

In Echtzeit-Zellanalysen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Alisertib die Proliferation von A-375-Zellen mit 200 nM nicht signifikant beeinflusst. Bei den A-375-TS-Zellen wurde die Proliferation, bei gleicher Inhibitorkonzentration moderat abgeschwächt. In der Kombinationsbehandlung mit TRAIL konnte die Proliferation allerdings in beiden Zelllinien signifikant blockiert werden. TRAIL alleine hat in A-375-Zellen initial eine antiproliferative Wirkung, die dann aber aufgehoben wird. Hier kommen einsetzende Resistenzmechanismen, wie Selektion, aber auch der Verbrauch von TRAIL erklärend in Betracht. In der Kombination mit Alisertib wird die Proliferation nachhaltig unterdrückt und der TRAIL-Effekt verstärkt. Dies lässt vermuten, dass die von dem Inhibitor entfaltete Wirkung auf Ebene des Zellzyklus die Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren kann. In der induziert resistenten A-375-TS Melanomzelllinie wurde dies überprüft und auch hier konnte ein antiproliferativer Effekt in der Kombinationsbehandlung belegt werden. Nachdem TRAIL in diesem Fall keine Apoptose induzieren konnte und auch Alisertib keinen signifikanten antiproliferativen Effekt hatte, wurde der Ansatz einer Kombinationstherapie in weiteren Experimenten genauer untersucht.

Eine Überprüfung eines proapoptotischen Effekts von Alisertib, der in verschiedenen Tumorzelllinien bereits beschrieben wurde (Humme et al., 2015, Liu et al., 2013), konnte zeigen, dass der Inhibitor auch in A-375-Zellen und A-375-TS-Zellen Apoptose induzieren konnte. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen durch die Behandlung mit Alisertib, in einer Konzentration von 200 nM, betrug zwischen 18 % und 24 %. Dabei waren die Apoptoseraten dosisabhängig. In den Zelllinien Mel-HO, Mel-2a und Me-Wo konnte der Inhibitor keine signifikante Apoptose induzieren. Bei Humme et al. 2015 reagierten unterschiedliche Zelllinien ebenfalls nur teilweise mit Apoptose.

Die Kombinationsbehandlung mit TRAIL führte in A-375-Zellen zu einer additiven Verstärkung der Apoptose auf 41 % bis 45 %. In den TRAIL-selektierten A-375-TS-Zellen konnte eine synergistische Verstärkung der Apoptose in der Kombinationstherapie nachgewiesen werden. Parallel zu der quantitativen Analyse der apoptotischen Zellen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich der charakteristische G1/G2-Arrest, wie er bereits für Aurokinase A-Inhibition beschrieben wurde (Humme et al., 2015; Sun et al., 2015). Besonders deutlich zeigte sich ein G2-Arrest in Mel-2a-Zellen und MeWo-Zellen, die allerdings nicht mit Apoptose reagierten. Daraus ergab sich die Frage nach der tatsächlichen Viabilität der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der nicht viablen Zellen signifikant über den apoptotischen Zellen bei 60% lag. Die Behandlung mit TRAIL alleine führte zu 25% nicht viabler Zellen, während die Behandlung mit Alisertib nur zu 5% nicht viabler Zellen führte. Diese synergistische Wirkung von TRAIL und Alisertib konnte aktuell auch im Mausmodell nachgewiesen werden (Liu et al., 2015).

Die Zytotoxizität wurde parallel zu den Apoptoseexperimenten überprüft und es wurde keine signifikante Zytotoxizität durch Alisertib festgestellt. Die Zytotoxizität, die sich nach der TRAIL-Behandlung zeigte, ist als sekundär zu werten, da in vitro keine Makrophagen vorhanden sind, die in vivo die durch die Apoptose zugrunde gegangenen Zellen autophagieren. Die von TRAIL induzierte Wirkung ist nicht zytotoxisch (Berger et al. 2011; Quast et al. 2014).

### **5.3 Keine Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch Alisertib**

Der mitochondriale Signalweg in Melanomzellen ist von zentraler Bedeutung für die Regulation der Apoptose und wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Es zeigte sich dabei, dass die Behandlung mit TRAIL keinerlei Veränderungen auf Ebene der hier überprüften Bcl-2 Proteine auslöste. Auch die Aktivierung der Caspase-9 konnte nicht nachgewiesen werden. Die bei einer bestehenden Resistenz gegen TRAIL vorhandene Blockade der autokatalytischen Aktivität der Caspase-3 hat eine insuffiziente Aktivierung der gesamten Caspasenkaskade zur Folge (Berger et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch Alisertib zu keiner Aktivierung der Caspasenkaskade kommt. Weder die Initiatorcaspase-8 noch die Effektorcaspase-3 konnten durch die Alisertib-Behandlung aktiviert werden. Die Kombinationsbehandlung mit TRAIL führte allerdings zu einer signifikanten Aktivierung von Caspase-8 und -3. Die Caspase-3 wurde sowohl in A-375 als auch den TRAIL-selektierten A-375-TS-Zellen prozessiert und damit aktiviert.

Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotentials, dessen Zusammenbruch charakteristisch für apoptotische Zellen ist, konnten in der Vergangenheit mehrfach zeigen, dass die Behandlung mit TRAIL zu einem deutlichen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt (Berger et al., 2011, Quast et al., 2014). In den parentalen A-375-Zellen sind bis zu 40 % der Zellen betroffen, während dieser Effekt bei den A-375-TS-Zellen vollständig blockiert ist. Diese Blockierung konnte z.B. durch die Kombination von TRAIL und Indirubin aufgehoben werden (Berger et al., 2011). Der von TRAIL ausgelöste Zusammenbruch des Membranpotentials in den A-375-Zellen konnte bereits nach 2 h nachgewiesen werden und liegt damit initial vor Einsetzen der Apoptose. Die durch den Zusammenbruch des Membranpotentials aus dem Mitochondrium freigesetzten proapoptischen Proteine Cytochrom C und AIF führen über den intrinsischen Signalweg in die Apoptose (Gottlieb et al., 2003). Nach 8 h, wenn die Apoptose einsetzt, zeigt sich der von TRAIL ausgelöste Effekt noch deutlicher und findet sich nach 24 h der, im Zuge des Membranpotentialzusammenbruchs bei 40 % der Zellen. Bei den A-375-TS-Zellen bleibt dieser Effekt aus.

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Kombination von Alisertib und TRAIL diese Blockierung überwinden kann. Interessanterweise reagieren die Zellen nach der Behandlung mit Alisertib zu frühen Zeitpunkten nicht mit Veränderungen am Membranpotential. Später führt Alisertib zu einer signifikanten Hyperpolarisation der Membran nach 24 h. In den A-375-Zellen verstärkt die Kombination mit Alisertib den von TRAIL ausgelösten Zusammenbruch des Membranpotentials signifikant. Auch in den A-375-TS-Zellen führt die Kombination zu einer Induktion des Membranpotentialzusammenbruchs. Allerdings ist dieses Ereignis nicht initial, sondern muss im Zuge der Apoptose eingeordnet werden. Auch dies passt zu den übrigen Ergebnissen der Arbeit, bei denen Alisertib keine Effekte auf den mitochondrialen Apoptoseweg hatte. Darüberhinaus erbrachte die Untersuchung der ROS-Spiegel, deren Anstieg ebenfalls mit einer mitochondrialen Aktivierung assoziiert ist, keinen Hinweis auf die Entstehung von ROS durch Alisertib.

### **5.4 Aktivierung des extrinsischen Signalweges durch Alisertib**

Der extrinsische Signalweg, der durch die Resistenz gegen TRAIL blockiert ist, wird durch Alisertib wieder aktivierbar. Die Caspasen-8 und -3 werden nach der Kombinationsbehandlung in den TRAIL-selektierten Zellen gespalten. Für eine Caspasenaktivierung sprechen die Ergebnisse aus den Apoptoseexperimenten, in denen zusätzlich der Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph eingesetzt wurde. Q-VD-Oph hat eine antiapoptotische Wirkung und blockiert die TRAIL-induzierte, caspasenabhängige Apoptose

vollständig. Auf die Wirkung von Alisertib hatte Q-VD-Oph keinen signifikanten Einfluss. Auch in der Kombinationsbehandlung war der Pan-Caspase-Inhibitor nicht in der Lage, die von Alisertib induzierte Wirkung zu blockieren. Dies spricht für einen Caspase-unabhängigen Mechanismus von Alisertib.

### **5.5 Die Rolle des Tumorsuppressors p53 bei der durch Alisertib-vermittelten Sensitivierung für die TRAIL induzierte Apoptose**

Der Dialog zwischen einer Aurorakinase A-Überexpression und der Herabregulierung von p53, ist schon länger im Fokus der Forschung zur Tumorgenese im Zusammenhang mit Aurorakinase A. Die mit Aurorakinase A-Überexpression einhergehenden Veränderungen in den Zellen, wie Aneuploidie, genomische Instabilität, Fehler in der Zellteilung, die Umgehung von Zellzykluskontrollmechanismen und die Dysregulation der Transkriptionsfaktoren AP-2alpha und NFkappaB begünstigen Tumorwachstum, Apoptoseresistenz und Chemotherapieresistenz. Die Herabregulierung von p53 eliminiert darüber hinaus einen wichtigen Kontrollmechanismus im Zellzyklus (Meraldi et al., 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass Aurorakinase A und p53 in einem streng reguliertem negativen Feedback-Loop involviert sind, der in maligne entarteten Zellen blockiert ist (Katayama et al., 2004). Die Phosphorylierung von S315 durch Aurorakinase A induziert den MDM2-abhängigen p53 Abbau. Dagegen hat p53 eine inhibierende Wirkung auf die Aurorakinase A-Aktivität (Chen et al., 2002). Der in dieser Arbeit verwendete Aurorakinase A-Inhibitor wurde kürzlich mit einem MDM2-Inhibitor kombiniert und es konnte die Aktivierung von p53 nachgewiesen werden (Vilgelm et al., 2015).

Während die Rolle von p53 für die Tumorgenese von epithelialen Tumoren relativ gut belegt ist, ist die Rolle von p53 im Melanom umstritten. Anders als in anderen Tumorentitäten, bei denen eine Mutation des Tumor-Suppressor-Gens p53 vorliegt, sind solche mutativen Veränderungen beim Melanom nicht nachgewiesen oder nicht signifikant und spielen daher eine untergeordnete Rolle. Einige Autoren diskutieren die Rolle von p53 bei der Regulierung der Hautpigmentierung durch UV-Strahlung (Box und Terzian, 2008). Die durch UV-Strahlung verursachten p53-Mutationen scheinen aber für die Entstehung des Melanoms keine Bedeutung zu haben. Hier steht die Suche nach weiteren Tumor-Suppressor-Genen im Fokus der Untersuchungen.

Umso bemerkenswerter ist es, dass in dieser Arbeit erstmalig ein signifikanter Anstieg von p53 auf Proteinebene in Melanomzellen durch Alisertib gezeigt werden konnte. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass TRAIL alleine nicht zu einer Verstärkung der p53-Expression führt (Berger et al., 2011; Fecker et al., 2006). Durch den Transkriptionsfaktor

p53 wird die Bildung von p21 induziert. Eine Verstärkung der Expression des Proteins p21 konnte parallel zum Anstieg von p53 in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die genauere Untersuchung in Kernfraktionsextrakten zeigte, dass p53 besonders im Kern akkumuliert. Der Anstieg von p53 und das damit verbundene Wiedereinsetzen eines wichtigen Zellzykluskontrollpunktes, passen zu den bekannten und in dieser Arbeit bestätigten Ergebnissen, dass die Inhibition von Aurorakinase A zu einem G2-Arrest führt. Die durch p53 entstehenden Effekte, wie die Hochregulierung von Todesrezeptoren oder die Aktivierung von Bax, wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, sind aber sicher interessante Ansatzpunkte für die weitere Aufklärung des Mechanismus, der durch Alisertib induzierten Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose.

### **5.6 Die mögliche Bedeutung der Kombination von Alisertib und TRAIL für den therapeutischen Einsatz von TRAIL für die Melanomtherapie**

Mit Alisertib steht ein Aurorakinase A-Inhibitor zur Verfügung, dessen gute Verträglichkeit bereits mehrfach nachgewiesen wurde und dessen antiproliferative und proapoptotische Wirkung in vorklinischen und klinischen Studien belegt ist. Dies macht diesen Inhibitor auch für die Melanomtherapie zu einem interessanten Kandidaten. In dieser Arbeit konnten erste Hinweise auf eine Bestätigung dieser in Alisertib gesetzten Hoffnungen gegeben werden. Aktuell wurde die Effektivität von Alisertib mit DR5-Antikörpern (Death Receptor-5-Antikörper) als Behandlung für Vemurafenib-resistente Melanompatienten vorgeschlagen und eine Seneszenz-induzierende Vorbehandlung mit anschließender Apo2L/TRAIL- oder DR5-Antikörper-Therapie diskutiert (Liu et al., 2015).

Besonders der Kombinationstherapie wird bei der Behandlung von therapieresistenten Tumorerkrankungen in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung beigemessen. Eine individualisierte, auf den Patienten abgestimmte und während der Behandlungszyklen immer wieder angepasste und modifizierte Therapie, stellt aus heutiger Sicht die Zukunft der Tumorthherapie dar. Im Fall von TRAIL könnte einer Kombinationsbehandlung eine besondere Bedeutung zukommen. Die Hoffnungen, die man vor 15 Jahren, nach der Entdeckung von TRAIL, in diese Therapiestrategie hatte, ließen sich in klinischen Studien bisher nicht bestätigen (Lemke et al., 2014; Walczak et al., 2000).

Neue für TRAIL-sensitivierende und dabei verträgliche Kombinationstherapieansätze sind für den klinischen Einsatz von TRAIL unerlässlich. Die in dieser Arbeit überprüfte Strategie der Kombination eines Aurorakinase A-Inhibitors und TRAIL stellt einen weiteren Baustein dar, der den Einsatz von TRAIL in der Melanomtherapie ermöglichen könnte. Die Überwindung von Apoptoseresistenz-mechanismen in Melanomzellen durch Alisertib ist besonders

interessant, da Alisertib, wie oben bereits erwähnt, seine gute Verträglichkeit und Wirksamkeit bereits in Studien der Phase II und III unter Beweis gestellt hat. Der Ansatz der Aurorakinase A Inhibition zur Sensitivierung von Tumorzellen für eine Kombinationsbehandlung ist aktuell in verschiedenen Tumorentitäten im Fokus der Untersuchungen zu neuen Chemotherapieansätzen (Humme et al., 2015; Liu et al., 2015; Sun et al., 2015).

Abschließend lässt sich festhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines TRAIL-Resistenz-Zellkulturmodells der Aurorakinase-Inhibitor Alisertib TRAIL-resistente Melanomzellen für eine TRAIL-Behandlung sensitivieren konnte. Vor dem Hintergrund aktueller Arbeiten zu diesem Thema, stellt dieser Weg eine weitere therapeutische Möglichkeit dar, um TRAIL in der Tumorthherapie erfolgreich einsetzen zu können. Um den zugrunde liegenden Mechanismus weiter aufzuklären, sollten weiterführende Arbeiten die Ursache der hier gezeigten Aktivierung von p53 abklären.



## Zusammenfassung

---

### **Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels eines selektiven Aurorakinase-A-Inhibitors**

Therapeutische Strategien beim metastasierten Melanom stellen immer noch eine Herausforderung dar. Ein Grund ist die hohe Rate der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika. Die Verwendung des Todesliganden TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ist ein interessanter Therapieansatz, da die proapoptotischen Effekte fast ausschließlich in Tumorzellen entfaltet werden und gesunde Zellen kaum beeinflusst werden. Die Eigenschaft von Tumorzellen, eine Resistenz gegen TRAIL aufzubauen, limitiert allerdings den therapeutischen Nutzen.

Einige Kinaseinhibitoren scheinen mögliche Kandidaten zu sein, eine TRAIL-Resistenz zu umgehen. Die Aurora-Kinase A gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und ist essentiell für die Zellteilung, den Eintritt in die Mitose und die Zytokinese. Eine Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten konnte nachgewiesen werden. Es ergab sich daraus die Frage, ob ihre Hemmung eine TRAIL-Resistenz beeinflussen kann. Zur Überprüfung dieser möglichen Strategie zur TRAIL-Sensitivierung, wurden TRAIL-sensitive Melanomzelllinien (A-375, Mel-HO) mit permanent resistenten Zelllinien (MeWo, Mel-2a) und Zelllinien mit einer induzierten TRAIL-Resistenz (A-375-TS; TRAIL-selektiert) verglichen.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der verwendete Aurora-Kinase-A-Inhibitor Alisertib (MLN 8237) Apoptose in A-375- und A-375-TS-Melanomzelllinien induziert, die proapoptotischen Effekte von TRAIL verstärkt und TRAIL-selektierte, resistente Zelllinien für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert. Darüber hinaus zeigte sich nach der Behandlung ein G2-Zellzyklusarrest, Polyploidie und ein antiproliferativer Effekt. Die Aktivierung von Caspase 8- und Caspase-3 wurde in der Kombinationsbehandlung von TRAIL mit Alisertib verstärkt. Alisertib induzierte eine Hyperpolarisation an der Mitochondrienmembran, während die Kombinationsbehandlung zu einer Verstärkung des von TRAIL-induzierten Verlustes des Membranpotentials führte. Dies konnte ebenfalls in den TRAIL-selektierten Zelllinien nachgewiesen werden. Interessanterweise führte die Behandlung mit Alisertib zu einem Anstieg des Zellzyklus-Inhibitors p21 sowie des Transkriptionsfaktors p53.

Dies deutet insgesamt daraufhin, dass der intrinsische Weg der Apoptose, der in Melanomzellen durch TRAIL aktiviert wird, durch Alisertib verstärkt wird. Die Aktivierung von p53/p21 durch Alisertib könnte hierbei eine Schlüsselrolle in der Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose darstellen. Die Ergebnisse machen den Aurora-Kinase A-Inhibitor Alisertib zu einem interessanten Kandidaten zur Überwindung einer TRAIL-Resistenz und zu einer neuen Therapiestrategie beim metastasierenden Melanom.

## Summary

---

### **Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by a selective Aurora-kinase-A-inhibitor**

**Cyprienne Isabell Geilen**

Therapeutic strategies in metastatic melanoma are still a challenge because of its high resistance against traditional chemotherapeutics. While TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) has been shown to be an interesting candidate for inducing apoptosis in cancer cells without affecting normal cells, the ability of cancer cells to develop resistance limits its therapeutic potential.

Various kinase inhibitors seemed to be possible candidates to overcome TRAIL resistance. Aurora kinase A, belonging to the family of serine/threonine kinases essential for cell division, mitotic entry and cytokinesis, was shown to be overexpressed in a variety of tumor entities.

TRAIL-sensitive melanoma cells (A-375, Mel-HO) were compared to permanent resistant cell lines (MeWo, Mel-2a) and cell lines with an inducible TRAIL-resistance (A-375-TS; TRAIL-selected).

Aurora kinase A inhibitor (Alisertib MLN 8237) induced apoptosis in melanoma cell lines A-375 and A-375-TS, enhanced the proapoptotic effect of TRAIL and sensitized TRAIL-selected cell lines for TRAIL-induced apoptosis. Poliploidy and G2 arrest and an antiproliferative effect occurred after treatment. Caspase 8 and 3 activation were enhanced in the combination of TRAIL and Alisertib treatment. It caused hyperpolarisation at the mitochondrial membrane and induced enhancement of the breakdown of membrane potential through TRAIL-treatment. This occurred even in cell lines with induced TRAIL-resistance. Treatment of melanoma cell lines, A-375 and A-375-TS with Alisertib, led to upregulation of p53 and p21. This activation of p53/p21 could be a key event in the sensitivation for TRAIL-induced apoptosis by Alisertib. In conclusion, the Aurora kinase A inhibitor Alisertib seemed to be highly effective candidate to overcome TRAIL-induced resistance in melanoma cells and in combination of TRAIL, and Alisertib may be a promising therapeutic strategy in metastatic melanoma.

## 6. Literatur

---

- Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R. The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Ann N Y Acad Sci* 926: 52-63, 2000
- Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 715-720, 2002
- Adler V, Yin ZM, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18: 6104-6111, 1999
- Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 337-348, 2003
- Amarante-Mendes GP, Griffith TS. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacol Ther* 15: 117-131, 2015
- Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR. Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* 15: 672-83, 2003
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2: 420-430, 2002
- Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*: doi: 10.1155/2010/583748, 2010
- Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9: 239-271, 2014
- Berger A, Quast SA, Plötz M, Hein M, Kunz M, Langer P, Eberle J. Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivate – Enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Biochem Pharmacol* 81: 71-81, 2011
- Berger A, Quast SA, Plötz M, Kammermeier A, Eberle J. Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by BMS-345541 correlates with altered phosphorylation and activation of Bax. *Cell Death Dis*: doi: 10.1038/cddis.2012.198, 2013
- Blank CU, Hooijkaas AI, Haanen JB, Schumacher TN. Combination of targeted therapy and immunotherapy in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 60: 1359-1371, 2011
- Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 725-731, 2003

- Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma; *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 525-33, 2008
- Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 123: 3209-3214, 2010
- Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T-cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 52-64, 2008
- Brenner M, Berking C. Principles of skin pigmentation. Biochemistry and regulation of melanogenesis. *Hautarzt* 61: 554-60, 2010
- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172: 902-908, 1970
- Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): Caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11: 591-595, 2004
- Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 842-54, 2003
- Chen SS, Chang PC, Cheng YW, Tang FM, Lin YS. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J* 21: 4491-4499, 2002
- Chipuk JE, Moldovaenu T, Llambi F, Parson MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37: 299-310, 2010
- Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. Histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of skin. *Cancer Res* 29: 705-727, 1969
- Clark WH. Tumor progression and the nature of cancer. *Brit J Cancer* 64: 631-644, 1991
- Collins AR. Oxidative DNA damage, and cancer. *Bioessays* 21: 238-246, 1999
- Cretney E, Takeda K, Smyth MJ. Cancer: Novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 280-286, 2007
- Dees EC, Cohen RB, von Mehren M, Stinchcombe TE, Liu H, Venkatakrisnan K, Manfredi M, Fingert H, Burris HA, Infante JR. Phase I study of aurora A kinase inhibitor MLN8237 in advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and bioavailability of two oral formulations. *Clin Cancer Res* 18: 4775-4784, 2012

- Deveraux QL, Leo E, Stennicke H, Welsh K, Salvesen G, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO* 18: 5242-5251, 1999
- Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19: 388-398, 1999
- de Braud F, Khayat D, Kroon BBR, Valdagni R, Bruzzi P, Cascinelli N. Malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 47: 35-63, 2003
- Degli-Esposti M. To die or not to die – the quest of TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 65: 535-542, 1999
- Dimberg Y, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A, Ford HL. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32: 1341-1350, 2013
- Dimberg LY, Cabrera H, Menke C, Behbakht K, Porter CC, Taan AC, Thorburn A, Ford HL. Use of genome wide loss of function screen to identify novel mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Eur J Cancer* 48: 31-32, 2012
- Di Pietro R, Zauli G. Emerging non-apoptotic functions of tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* 201: 331-340, 2004
- Dogan T, Harms GS, Hekman M, Karreman C, Oberoi TK, Alnemri ES, Rapp UR, Rajalingam K. X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol* 10: 1447-1455, 2008
- Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, Rowert-Huber J, Stockfleth E. Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *Br J Dermatol* 156 (Suppl 3): 18-24, 2007
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FI. Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports* 7: 988-994, 2006
- Eckelman BP, Drag M, Snipas SJ, Salvesen GS. The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains ; *Cell Death Differ* 15: 920-928, 2008
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signaling: Decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1462-1475, 2007
- Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, Schwarz C, Daniel PT, Eberle J. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary

- melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol* 126: 1366–1371, 2006
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Diff* 10: 76-100, 2003
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *New Engl J Med* 363: 809-819, 2010
- Friedberg JW, Mahadevan D, Cebula E, Persky D, Lossos I, Agarwal AB, Jung J, Burack R, Zhou X, Leonard EJ, Fingert H, Danaee H, Bernstein SH. Phase II study of alisertib, a selective Aurora A kinase inhibitor, in relapsed and refractory aggressive B and T-cell non Hodgkin lymphomas. *J Clin Oncol* 32: 44-50, 2014
- Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathway in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811, 2006
- Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Rev Drug Discov* 11: 109-124, 2012
- Fulda S. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins: novel insights into the cancer-relevant targets for cell death induction. *ACS Chem Biol* 4: 499-501, 2009
- Franke JC, Plötz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J. New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathway are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochem Pharmacol* 79: 575-586, 2010
- Friedberg JW, Mahadevan D, Cebula E, Persky D, Lossos I, Argawal AB, Jung J, Burack R, Zhao Y, Leonard EJ, Fingert H, Danaee H, Bernstein SH. Phase II study of Alisertib, a selective aurora A kinase inhibitor, in relapsed and refractory aggressive B and T-cell non-Hodgkin lymphomas. *J Clin Oncol* 1: 44-50, 2014
- Galban S, Duckett CS. XIAP as an ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Diff* 17: 54-60, 2010
- Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trend. *Clin Dermatol* 27: 3-9, 2009
- Gillissen B, Wendt J, Richter A, Muer A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* 188: 851-862, 2010
- Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81: 95-105, 1995

- Goldin LR, Landgren O. Autoimmunity and lymphoma genesis. *Int J Cancer* 124: 1497-1502, 2009
- Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29: 4752-4765, 2010
- Goossens V, de Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompemolle K, Fiers W, Vandenameele P, Grooten J. Redox regulations of TNF signaling. *Biofactors* 10: 145-156, 1999
- Gorgun G, Calabrese E, Hideshima E, Ecsedy J, Perrone G, Mani M, Ikeda H. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN 8237 induces cytotoxicity and cell cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* 115: 5202-5213, 2010
- Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and Cytochrome C release during apoptosis. *Cell Death Diff* 10: 709-717, 2003
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629, 2004
- Gremel G, Rafferty M, Lau TYK, Gallagher WM. Identification and functional validation of therapeutic target for malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 72: 194-214, 2009
- Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9: 1420-6, 2003
- Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19: 4604-4610, 2000
- Gyrd-Hansen M, Meier P. IAP: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 561-574, 2010
- Harada H, Grant S. Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7: 117-138, 2003
- Harmer M, Denoix P, Hamperl H. The TNM-system. *Aktuelle Probl Chir* 14: 25-36, 1970
- Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, Riess ML, Varadarajan SG, Camara AK. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1400-H1407, 2007



- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000
- Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, Gordon MS, Novotny W, Goldwasser MA, Tohnya TM, Lum BL, Ashkenazi A, Jubb AM, Mendelson DS. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 28: 2839-2846, 2010
- Herbst RS, Kurzrock R, Hong DS, Valdivieso M, Hsu CP, Goyal L, Juan G, Hwang YC, Wong S, Hill JS, Friberg G, LoRusso PM. A first-in-human study of Conatumumab in adult patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 16: 5883-5891, 2010
- Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114: 585-98, 2003
- Hossini AM und Eberle J. Apoptosis induction by BCL-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochem Pharmacol* 76: 1612-1619, 2008
- Hornle M, Peters N, Thayaparasingham B, Vorsmann H, Kashkar H, Kulms D. Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 30: 575-587, 2011
- Huang JL-Y, Urtatiz O, Van Raamsdonk CD. Oncogenic G protein GNAQ induces uveal melanoma and intravasation in mice. *Cancer Res* 75: 3384-3397, 2015
- Humme D, Haidar A, Möbs M, Mitsui H, Suárez-Farinas M, Ohmatsu H, Geilen CI, Eberle J, Krueger JG, Beyer M, Hummels M, Anagnostopoulos I, Sterry W, Assaf C. Aurora kinase-A is upregulated in cutaneous T-cell lymphoma and represents a potential therapeutic target. *J Invest Dermatol* 135: 2292-2300, 2015
- Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71: 907-920, 2002
- Jeng YM, Peng SY, Lin CY, Hsu HC. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 2065-71, 2004
- Jiang C, Wu Y, Zhou J, Zhao J. Novel targets and small molecular interventions for liver cancer. *Biomed Res Int*: doi: 10.1155/2014/148783, 2014
- Jin ZY, McDonald ER, Dicker DT, El Deiry WS. Deficient tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279: 35829-35839, 2004

- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108: 153-164, 2002
- Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 782-798, 2008
- Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DCS, Bouillet P, Thomas HE, Borner C, Silke J, Strasser A, Kaufmann T. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460: 1035-1039; 2009
- Kaidbey KH, Agin PP, Sayre RM, Kligman AM. Photoprotection by melanin – a comparison of black and Caucasian skin. *J Am Acad Dermatol* 1: 249-260, 1979
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12: 390-399; quiz 400-401, 2002
- Kannappan R, Ravindran J, Prasad S, Sung B, Yadav VR, Reuter S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Gamma-tocotrienol promotes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase/p53-mediated upregulation of death receptors. *Mol Cancer Ther* 9: 2196-2207, 2010
- Katayama H, Ota T, Jisaki F, Ueda Y, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F, Terada Y, Tatsuka M. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 91: 1160-1162, 1999
- Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. Phosphorylation by aurora kinase A induces MDM2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 36: 55-62, 2004
- Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Diff* 18: 1414-1424, 2011
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* 4: 924-933, 2005
- Kelley SK und Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 4: 333-339, 2004

- Kim DS, Jeon BK, Lee YE, Woo WH, Mun YJ. Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*: doi: 10.1155/2012/981675, 2012
- Kim KH, Fisher MJ, Xu SQ, El Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 6: 335-346; 2000
- Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 3. Vollständig überarbeitet und erweiterte Auflage; 2003
- Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7: 532-542, 2007
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C . Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163, 2007
- Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff* 6: 1060-1066, 1999
- Kurbanov BM, Fecker LF, Geilen CC, Sterry W, Eberle J. Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kappaB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4. *Oncogene* 26: 3364-3377, 2007
- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275, 2008
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenameele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14: 44-55, 2007
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118: 265-267, 2005
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Diff* 10: 66-75, 2003
- Lee CC, Yang HL, Way TD, Kumar KJS, Juan YC, Cho HJ, Lin KY, Hsu LS, Chen SC, Hseu YC. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis by *Androea camphorata* in HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells through the induction of ROS, depletion of HER-2/neu and disruption of PI3K/Akt signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*: doi: 10.1155/2012/702857, 2012
- Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-598, 2001

- Lemke J, von Karstedt G, Zinngrebe J, Walczak H. Getting trail back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ* 21: 1350-1364, 2014
- Li DC, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. ROS control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 95: 644-650, 2004
- Li ZY, Yang Y, Ming M, Lui B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 414: 5-8, 2011
- Liu Y, Hawkins OE, Su Y, Vilgelm AE, Sobolik T, Thu YM, Kantrow S, Splittgerber RC, Short S, Amiri KI, Ecsedy JA, Sosman JA, Kelley MC, Richmond A. Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF-kappaB impairs this drug-induced senescence. *EMBO Mol Med* 5: 149-166, 2013
- Liu Y, Hawkins OE, Vilgelm AE, Pawlikowski JS, Ecsedy JA, Sosman JA, Kelley MC, Richmond A. Combining an aurora kinase inhibitor and a death receptor ligand/agonist antibody triggers apoptosis in melanoma cells and prevents tumor growth in preclinical mouse models. *Clin Cancer Res* 21: 5338-5348, 2015
- Mahaligam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signaling and modulation: Are we on the right TRAIL?. *Cancer Treat Rev* 35: 280-288, 2009
- Mandal R, Becker S, Strebhardt K. Stamping out RAF and MEK1/2 to inhibit the ERK1/2 pathway: an emerging threat to anticancer therapy. *Oncogene*: doi: 10.1038/onc.2015.329, 2015
- Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Lock R, Carol H, Keir ST, Reynolds CP, Kang MH, Wu J, Smith MA, Houghton PJ. Initial testing of the Aurora A inhibitor MLN 8237 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 55: 26-34, 2010
- Maryanovich M, Gross A. ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol* 23:129-134, 2013
- Masci P, Borden EC. Malignant melanoma: Treatments emerging, but early detection is still key. *Cleve Clin J Med* 69: 529, 2002
- Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* 17: 53-64, 2010
- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, Hideshima T, Anderson KC. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98: 795-804, 2001

- Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano JP, Khayat D. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 74: 27-39, 2010
- Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. Melanoma: New Insights and new therapies; *J Invest Dermatol* 132: 854-863, 2012
- Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Golemis EA. Aurora-A kinase (AURKA) in normal and pathological cell growth, *Cell Mol Life Sci* 70: 661-687, 2013
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of the cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 396: 95-100, 2010
- Nunez G, Benedict MA, Hu YM, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245, 1998
- Pacheco I, Buzea C, Tron V. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma; *Expert Rev Mol Med*: doi: 10.1017/S146239941100202X, 2011
- Pitti RM, Marsters MA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271: 12687-12690, 1996
- Pirker C, Lötsch D, Spiegl-Kreinecker S, Jantscher F, Sutterlüty H, Micksche M, Grusch M, Berger W. Response of experimental malignant melanoma modelst o the pan-aurora kinase inhibitor VE-465. *Exp Dermatol* 12: 1040-1047, 2010
- Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, specificity and regulation. *J Biol Chem* 284: 21777-21781, 2009
- Quast SA, Berger A, Plötz M, Eberle J. Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by activation of the mitochondrial pathway via Bax. *Eur J Cell Biol* 93: 42-48; 2014
- Reichardt W, Jung V, Brunner C, Klein A, Wemmert S, Romeike BF, Zang KD, Urbschat S. The putative serine/threonine kinase gene STK15 on chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas. *Oncol Rep* 10: 1275-1279, 2003
- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907, 2004
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun CH, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800, 2001

- Rupinder SK, Gurpeet AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 46: 383-393, 2007
- Sadidi M, Lentz Si, Feldman EL. Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie* 91: 577-585, 2009
- Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 401-410, 2002
- Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 24: 645-655, 2005
- Sells T, Ecsedy J, Stroud S. MLN 8237: an orally active small molecule inhibitor of Aurora A kinase in phase I clinical trials. AACR Annual Meeting, 12-16 April 2008, San Francisco, CA, USA, Abstract 237, 2008
- Sen S, Zhou H, White RA. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14: 2195-2200, 1997
- Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanoma. *Nat Rev Cancer* 16 (6): 345-358, 2016
- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459-470, 2002
- Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22: 3138-3151, 2003
- Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Linardopoulos S, Chieffi P, Fusco A, Portella G. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 928-35, 2004
- Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 3: 535-546, 2001
- Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 6: 1845-1853, 2000

- Sun JM, Yang LN, Xu H, Chang B, Wang HY, Yang G. Inhibition of Aurora promotes chemosensitivity via inducing cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Am J Cancer Res* 5: 1133-45, 2015
- Tanaka S, Sugimachi K, Shirab K, Shimada M, Wands JR. Expression and antitumor effects of TRAIL in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 32: 523-527, 2000
- Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304: 843-846, 2004
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity and immune correlates of Anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454, 2012
- Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization ion cancer cells. *Front Oncol*: doi: 10.3389/fonc.2015.00069, 2015
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with T-(14-18) chromosome. *Translocation Sci* 226: 1097-1099, 1984
- Vaculova A, Kaminsky V, Jalalvand E, Surova O, Zhivotovsky B. Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cell expressing caspase-8 to TRAIL. *Mol Cancer* 9: 1-13. 2010
- Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1786: 60-72, 2008
- Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 7: 163-166, 2002
- Vermeulen K, van Bockstaele DR, Bememan ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84: 627-639, 2005
- Vogt C. Untersuchung über die Entwicklung der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Verlag Jent und Gassman, S. 130, Solothurn, 1842
- Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2 or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res* 60: 3051-3057, 2000



- Wang X, Moschos SJ, Becker D. Functional analysis and molecular targeting of aurora kinases A and B in advanced melanoma. *Genes Cancer* 9: 952-963, 2010
- Wang SL, El Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628-8633, 2003
- Wang ZB, Lui YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29: 489-496, 2005
- Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med Chem* 5: 53-67, 2013
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. Identification and characterization of a new member of the TNF-family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-682, 1995
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306, 1980
- Xu Y, Zhou LP, Huang J, Lui F, Yu J, Zhan QM, Zhang L, Zhao XH. Role of Smac in determining the chemotherapeutic response of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 17: 5412-5422, 2011
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59, 2008
- Younes A, Vose JM, Zelenetz AD, Smith MR, Burris HA, Ansell SM, Klein J, Halpern W, Miceli R, Kumm E, Fox NL, Czuczman MS. A phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 103: 1783-1787, 2010
- Zhang LD und Fang BL. Mechanisms of resistance to TRAIL- induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12: 228-237, 2005
- Zhang XD, Wu JJ, Gillespie S, Borrow J, Hersey P. Human melanoma cells selected for resistance to apoptosis by prolonged exposure to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand are more vulnerable to necrotic cell death induced by cisplatin. *Clin Cancer Res* 12: 1355-1364, 2006
- Zhang D, Hirota T, Marumoto T, Shimizu M, Kunitoku N, Sasayama T, Arima Y, Feng L, Suzuki M, Tekeya M, Saya H. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene* 23: 8720-8730, 2004

Zhou W, Shi J, Niu Z, Luo H, Tian H, Gao J, Yu F, Li S. SmacN7 enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand or gemcitabine. *Oncol Lett* 5: 1760-1764, 2013

Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol* 20: 97-103, 2008

## 7. Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 1:</b> Stadien der Melanomprogression	4
<b>Abbildung 2:</b> Die ABCD-Kriterien beim malignen Melanom	5
<b>Abbildung 3:</b> Unterteilung des Melanoms in mehrere Haupttypen	7
<b>Abbildung 4:</b> Hauptsignalwege der Apoptose	13
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der Familie der Bcl-2-Proteine	15
<b>Abbildung 6:</b> Funktion von Caspasen in humanen Zellen	17
<b>Abbildung 7:</b> Caspasenaufbau	18
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung verschiedener Mitglieder der IAP-Proteinfamilie	20
<b>Abbildung 9:</b> Todesliganden und ihre Rezeptoren	22
<b>Abbildung 10:</b> Aurorakinase-Überexpression und ihre Folgen	27
<b>Abbildung 11:</b> Aurorakinase-Inhibitoren	29
<b>Abbildung 12:</b> Prinzip der Zytotoxizitätsbestimmung	36
<b>Abbildung 13:</b> BCA-Nachweismethode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
<b>Abbildung 14:</b> Basisexpression von Aurorakinase-A auf Proteinebene in verschiedenen Melanomzelllinien	44
<b>Abbildung 15:</b> Wirkung von Alisertib und TRAIL auf die Proliferation von A-375- und A-375-TS-Zellen	46
<b>Abbildung 16:</b> Zellmorphologie von A-375- und A-375 TS-Zellen nach Behandlung mit TRAIL, Alisertib und der Kombination	48

<b>Abbildung 17a:</b> Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Alisertib und TRAIL in A-375- und A-375-TS-Zellen	50
<b>Abbildung 17b:</b> Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-HO-Zellen	51
<b>Abbildung 17c:</b> Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-2a- und Me-Wo-Zellen	53
<b>Abbildung 18a:</b> Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL in A-375-Zellen	54
<b>Abbildung 18b:</b> Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-HO-Zellen	54
<b>Abbildung 18c:</b> Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL in Mel-2a- und Me-WO-Zellen	55
<b>Abbildung 19a:</b> Einfluss von TRAIL und Alisertib auf die Viabilität von A-375-Melanomzellen	56
<b>Abbildung 19b:</b> Quantitativer Einfluss von TRAIL und Alisertib auf die Viabilität von A-375-Melanomzellen	57
<b>Abbildung 20</b> Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Alisertib und TRAIL in A-375-, A-375-TS- und Mel-HO-Zellen	58
<b>Abbildung 21:</b> Überprüfung der Caspasenaktivierung durch TRAIL und Alisertib auf Proteinebene in der Western-Blot-Analyse	60
<b>Abbildung 22a:</b> Zellmorphologie von A-375-Zellen 24 h nach Behandlung mit TRAIL, Alisertib und der Kombinationsbehandlung in Anhängigkeit der Caspasenaktivität	61
<b>Abbildung 22b:</b> Zellmorphologie von A-375-TS-Zellen 24 h nach Behandlung mit TRAIL, Alisertib und der Kombinationsbehandlung in Anhängigkeit der Caspasenaktivität	62
<b>Abbildung 23a:</b> Apoptoseinduktion und Zellzyklusveränderungen durch TRAIL und Alisertib unter Einfluss des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-Oph	63

<b>Abbildung 23b:</b> Apoptoseinduktion durch TRAIL und Alisertib unter Einfluss des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-Oph	<b>64</b>
<b>Abbildung 24a:</b> Darstellung der Zellviabilität	<b>65</b>
<b>Abbildung 24b:</b> Quantitative Darstellung der Zellviabilität	<b>66</b>
<b>Abbildung 25:</b> Veränderungen am mitochondrialen Membranpotential nach Behandlung mit TRAIL und Alisertib	<b>68</b>
<b>Abbildung 26:</b> Expression von Bcl-2-Proteinen nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL	<b>69</b>
<b>Abbildung 27a:</b> Bestimmung der ROS-Spiegel nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL	<b>71</b>
<b>Abbildung 27b:</b> Bestimmung von ROS in A-375-Zellen	<b>72</b>
<b>Abbildung 28:</b> Bestimmung von ROS in A-375-TS-Zellen	<b>73</b>
<b>Abbildung 29:</b> Expression von p53 und p21 auf Proteinebene im Gesamtzellextrakt von A-375- und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL	<b>75</b>
<b>Abbildung 30:</b> Die zytosolische und nukleäre Expression von p53 in A-375- und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit Alisertib und TRAIL	<b>76</b>

## 8. Anhang

---

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
$\mu\text{M}$	Mikromolar
4E-BP1	Eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
%	Prozent

### A

A1/Bfl-1	Bcl-2-related protein A1
ABL	Abelson leukemia virus
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammoniumsalz
AIF	Apoptosis inducing factor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
alpha-Toco	alpha Tocopherol/Vitamin E
AMP-K	Adenosinmonophosphat-Kinase
AP-1	Activation protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfate
ATCC	American Type Culture Collection
Atg	Autophagy-related
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AURKA	Aurorakinase-A
AURKA-I	Aurorakinase-A-Inhibitor

### B

Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated protein X
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
Bcl-x <sub>L</sub>	Bcl-2-like 1 long
Bcl-x <sub>S</sub>	Bcl-2-like 1 short
BH-Domänen	Bcl-2-homology Domänen

BIR	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik/Nbk	Bcl-2 interacting killer/Natural born killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BSA	Bovine serum albumine

**C**

Cyt c	Cytochrom C
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cysteine-aspartate specific protease
CD95	Cluster of differentiation 95
CD95L	CD95 ligand
CDK	Cyclin-dependent kinase
c-FLIP	Cellular FLICE inhibitory protein
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis
c-Kit	Tyrosinkinase, Stammzellefaktor-Rezeptor
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen

**D**

DcR	TRAIL Decoy receptor
DD	Death domain
DED	Death effector domain
d.h.	das heißt
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DID	Death-inducing domain
DISC	Death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNS	Desoxynukleinsäure
DR	Death receptor
DTIC	Dacarbazine

**E**

ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat



---

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatic reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
<b>F</b>	
FACS	Fluorescence-activated cell sorting analyses
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FLIP	FADD-like ICE inhibitory protein
FSC	Forward scatter
<b>G</b>	
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigungskonstante
GAPDH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Proton
h	Stunde
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitoren
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradishperoxidase)
H <sub>2</sub> DCFDA	2-, 7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
<b>I</b>	
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IBM	IAP-binding motif
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
IFN- $\alpha$	Interferon alpha
Ig	Immunglobulin
I- $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B proteins
IL-2	Interleukin-2
IMM	innere Mitochondrienmembran

**J**

**K**

kDa Kilodalton

**L**

l Liter

LDH Laktat-Dehydrogenase

**M**

mAb Monoclonal antibody

MAPK Mitogen-activated protein kinase

Mcl-1 Myeloid cell leukaemia sequence-1

MEKK MAPK/ERK kinase kinase

mg Milligramm

Mg<sup>2+</sup> Magnesium-Proton

min Minute

Mito Mitochondriale Fraktion

ml Milliliter

mM Millimolar

mt mitochondrial

**N**

NAD<sup>+</sup> Nikotinamidadenindinukleotid

NADP Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NADPH reduzierte Form von NADP

Nbk/Bik Natural born killer/Bcl-2-interaktinng killer

NF-κB Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

ng Nanogramm

NK Natural killer

NOX NADP-Oxidase

Noxa angelehnt an das griechische Wort schädlich

NRAGE Neurotrophin-receptor-interacting melanoma antigen gene homologue

N-Terminus Amino-Terminus

**O**

OPG Osteoprotegrin

OS Gesamtüberleben (Overall survival)

**P**

PARP Poly-(ADP-ribose)-polymerases  
PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis  
PBS Phosphat-buffered saline  
PCR Polymerase chain reaction  
PD-1 Programmed death-1  
PDGF-R Platelet-derived Growth Factor-Receptor  
PDK-1 Protein-dependent kinase-1  
PH-Domäne Plekstrin homology-Domäne  
pH Potentia hydrogenii  
PI Propidium iodide  
PI(3,4)P<sub>2</sub> Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat  
PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat  
PIDD p53-induced protein with death domain  
PI3K Phosphatidylinositol-3-kinase  
PIKK PI3K-related kinase  
PKA Protein kinase A  
PKB Protein kinase B  
PKC Protein kinase C  
PMSF Phenylmethylsulfonylfluoride  
Puma p53 upregulated modulator of apoptosis  
PTB Protein tyrosine binding

**Q**

Q-VD-OPh Peptid: Quinoline-Valine-Aspartic-CH<sub>2</sub>-O-Phenyl

**R**

RAIDD RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain  
RAF Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
Ras Rat sarcoma  
RGP Radial Growth Phase  
RNA Ribonucleic acid  
ROS Reactive oxygen species - reaktive Sauerstoffradikale  
RT Raumtemperatur

RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
rpm	Rounds per minute
RTCA	Echtzeit-Zellanalyse (real-time cell analysis)

**S**

SCID	Severe combined Immuno-Deficiency- schwerer kombinierter Immundefekt
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SH-Gruppen	Sulfhydryl-Gruppen
siRNS	small interfering RNA
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
SSC	Side scatter
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom

**T**

tBid	Truncated Bid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TM	Transmembrane domain
TMRM <sup>+</sup>	Tetramethylrhodamine methylester perchlorate
TNF- $\alpha$	Tumour necrosis factor alpha
TNF-R	TNF receptor
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
Tris	Tris-[hydroxymethyl]amino-methane
TBS	Tris-buffered saline

**U**

UBA	Ubiquitin-associated
UBC	Ubiquitin-conjugation domain

**V**

V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-R            Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor  
VGP                Vertical Growth Phase

**W**

**X**

XAF1              XIAP-associated factor  
XIAP               X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

**Z**

z.B.                zum Beispiel

## Publikationsliste

Humme D, Haidar A, Möbs M, Mitsui H, Suárez-Farinas M, Ohmatsu H, **Geilen CI**, Eberle J, Krueger, JG, Beyer M, Hummels M, Anagnostopoulos I, Sterry W, Assaf C.

*Aurora kinase-A is upregulated in cutaneous T-cell lymphoma and represents a potential therapeutic target.*

J Invest Dermatol, 2015 Sep; 135(9):2292-300. Doi 10.1038/jid2015.139

**Geilen CI**, Plötz M, Quast SA, Steinhorst K, Geilen CC, Eberle J.

*Sensitization of human melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by a selective aurora kinase A inhibitor.*

J Mol Biochem, 2016, Vol.5, No.1(2016)

**Geilen CI**, Quast SA, Steinhorst K, Geilen CC, Eberle J.

*Cell cycle arrest, induction of apoptosis and sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by a selective aurora kinase-A inhibitor*

42. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung in Ulm, John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, Exp Dermatol, 2015; Doi:10:1111exd.12623

## Finanzielle Unterstützung und mögliche Interessenskonflikte

Die Autorin erhielt keine finanzielle Unterstützung. Verbrauchsmittel wurden zum Teil durch die Deutsche Krebshilfe, Melanomverbund; 10- 8008, TP7 finanziert.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privat-Dozent Dr. Jürgen Eberle, der mich während meiner Dissertation betreut hat. Er hat mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich stets dazu angeleitet meinen wissenschaftlichen Blick zu schärfen. Ich möchte mich bei ihm für die Unterstützung des Projektes, die Bereitstellung der technischen Mittel, die vielen Diskussionen und die hervorragende Betreuung bedanken, die wesentlich zu meiner Dissertation beitrugen.

Bei Herrn Professor Gruber bedanke ich mich für die Übernahme der Betreuung aus dem veterinärmedizinischen Fachbereich.

Frau Katja Steinhorst danke ich ganz besonders für ihr technisches Wissen und ihre praktische Anleitung und Hilfestellung im Laboralltag. Sie hat von der Pipettenspitze an auf Alles geachtet, mich stets geduldig unterstützt und war die Seele des Labors.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Annika Quast und Herrn Dr. Michael Plötz bedanken, die mich sowohl technisch, inhaltlich als auch moralische bis zum Schluss unterstützt haben und mir immer für fachliche Diskussionen und darüber hinaus zu Verfügung standen. Außerdem danke ich Dr. Anja Berger, Dr. Amir Houssini, Dr. Markus Möbs, Dr. Ahmed Haidar, und auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Walden sowie allen, die nicht persönlich genannt sind, für die nette Atmosphäre und Hilfe in der Gruppe und im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, in die ich die Familie Oppel einschließe. Ich danke meiner Mutter Ute, die mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Besonders danke ich meinem Vater Christoph Geilen, der mich in meinem Leben immer wieder in die richtige Richtung geschubst hat, meine Begeisterung für die Medizin und die Forschung geweckt hat, immer Zeit für mich hat, keinen meiner Träume klein erscheinen lässt und meine Liebe zu den Tieren gefördert hat und damit mein Leben maßgeblich geprägt hat. Ich danke auch meinem Freund Jan Ooppel, der diese Liebe teilt und mir immer Halt gibt und mich bestärkt.

Den Tieren, mit denen ich das Glück hatte und habe zu leben, danke ich für ihre Liebe und dafür, dass sie mich zu einem besseren Menschen machen, indem sie mir jeden Tag den Spiegel vor meine Seele halten. Besonders denke ich dabei an Charly, der mich von meinem Abitur bis zu meiner Dissertation begleitet hat.

Tiefe Dankbarkeit empfinde ich auch für die Freundschaft zu Sophie Essner, deren Schicksal mich darin bestärkt hat in der Krebsforschung zu arbeiten und mich immer wieder daran erinnert, dass ich nicht das Recht habe Angst vor den Herausforderungen des Lebens zu haben und unter meinen Möglichkeiten zu bleiben.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Cyprienne Isabell Geilen, geb. am 02.10.1986 in Berlin, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren des Fachbereichs für Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 15.12.2016

Cyprienne Isabell Geilen