

Sandra-Annika Quast

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Berlin, 2013

Freie Universität Berlin



Sensitivierung von Melanomzellen für die
TRAIL-induzierte Apoptose mittels
Signalwegsinhibitoren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sandra-Annika Quast
Berlin
2013

Die vorliegende Arbeit wurde vom SoSe 2009 bis zum SoSe 2013 in der AG Apoptoseregulation in Hauttumoren unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. J. Eberle in der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Privatdozent Dr. J. Eberle
2. Gutachter: Professor Dr. P. Knaus

Tag der Disputation: 13.02.2014

Meinen Eltern

Alle Wissenschaftler versuchen, an der Pyramide menschlichen Wissens weiter zu bauen.

Ich hoffe, dass ich einen kleinen Stein dazutun konnte.

Stephen Hawking

Zusammenfassung.....	6
Abstract.....	8
Einleitung.....	10
Das maligne Melanom	10
Epidemiologie und Progression.....	10
Klinische Charakteristika des Melanoms und Arten des Melanoms	11
Einteilung der Stadien und Prognose	14
Melanomtherapie bis heute	14
Der programmierte Zelltod - Apoptose	17
Andere Formen des Zelltods- <i>Nekrose, Nekroptose und Autophagie</i>	18
Signalwege der Apoptose.....	20
Der extrinsische Signalweg	20
Der intrinsische Signalweg.....	21
Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie.....	22
Apoptoseregulation durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS).....	25
<i>Caspasen</i>	26
<i>Rolle der Caspasen in der Apoptose</i>	27
<i>Kontrollmechanismen der Caspasen</i>	30
<i>Regulation der IAPs durch natürliche Antagonisten</i>	32
TRAIL.....	33
TRAIL und seine Rezeptoren	33
<i>Aktivierung alternativer Signalwege durch TRAIL</i>	35
<i>Resistenzentwicklung</i>	36
<i>Anwendung von TRAIL in der Tumorthherapie</i>	37
<i>Proteinkinasen</i>	39
<i>Veränderungen im PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweg</i>	44
<i>Regulierung der Proteinkinasen des PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalwegs</i>	45
Ca ²⁺ -abhängige Kaliumkanäle.....	47
Ca ²⁺ -abhängige Kaliumkanäle mit intermediärer Leitfähigkeit oder KCa3.1	47
Pathophysiologische Rolle der KCa3.1 Kanäle.....	49
Regulation von KCa3.1	50
Inhibition der KCa3.1-Kanäle	50
Experimentelle und klinische Anwendung von KCa3.1-Inhibitoren.....	52
Fragestellung.....	54
Ergebnisse	55
Strategie I - Sensitivierung durch den Kaliumkanalinhibitor TRAM-34	55
Nachweis von KCa3.1 (IK1) in diversen Melanomzelllinien.....	55
Antiproliferative Effekte von TRAM-34.....	56
TRAM-34 sensitiviert für die Todesliganden-induzierte Apoptose	57
Involvierung von Ca ²⁺ in der TRAM-verstärkten TRAIL-induzierten Apoptose.....	61
Synergismusstudien zu TRAM-34 und TRAIL.....	63
Effekte von TRAM-34 auf die TRAIL-Rezeptoren.....	64

Aktivierung der Caspasen	66
Aktivierung des mitochondrialen Signalweges.....	67
Abhängigkeit der TRAM-34-vermittelten Sensitivierung von Bcl-2 Proteinen	68
Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren	70
Verbindung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges über Bid.....	72
Die maßgebliche Rolle des SMAC-IAP Gleichgewichtes	73
Strategie II - Sensitivierung durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin.....	76
Wortmannin verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose	76
Keine Caspasenaktivierung durch Wortmannin/TRAIL.....	77
Wortmannin-Behandlung führt zur Produktion von ROS.....	78
Aktivierung des mitochondrialen proapoptotischen Signalweges	80
Die Bedeutung von Bcl-2.....	82
Die essenzielle Rolle von Bax in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose	83
Wortmannin aktiviert Bax durch Veränderungen des Phosphorylierungsstatus	85
Modell zur Sensitivierung durch Wortmannin.....	87
Strategie III - Sensitivierung durch den mTOR-Kinaseinhibitor Rapamycin	89
Antiproliferative Effekte von Rapamycin.....	89
Rapamycin sensitiviert für die TRAIL-induzierte Apoptose	91
Keine Caspasenaktivierung durch Rapamycin/TRAIL.....	93
Keine Regulation der Bcl-2-Proteine und der IAPs.....	94
Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und Produktion von ROS.....	94
Die Rolle von Bcl-2 in der Rapamycin-verstärkten TRAIL-induzierten Apoptose	96
Bax ist von essenzieller Bedeutung für die Rapamycin -verstärkte Apoptose.....	97
Rapamycin hat einen Einfluss auf die Bax-Phosphorylierung	98
Diskussion	100
Strategie I - Sensitivierung durch den Kaliumkanalinhibitor TRAM-34.....	100
Die Bedeutung von TRAIL für das Melanom.....	100
Effekte des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34.....	101
Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch TRAM-34.....	102
Mechanismen der TRAM-34-vermittelten TRAIL-Sensitivierung.....	102
Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch TRAM-34.....	103
Die Bedeutung des SMAC-cIAP-Gleichgewichts für die Sensitivierung.....	104
Strategie II - Sensitivierung durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin.....	105
Effekte von ROS und des Akt/PKB-Signalweges auf die Apoptose	105
ROS reguliert die Phosphorylierung von Bax an Threonin-167	106
Aktivierung des mitochondrialen Signalweges.....	107
Nachgeschaltete Signalwege in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose	108
Strategie III - Sensitivierung durch den mTOR-Kinaseinhibitor Rapamycin.....	109
Effekte von Rapamycin.....	109
TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen durch Rapamycin.....	110
Mechanismen der Rapamycin-vermittelten TRAIL-Sensitivierung	111
Die Bedeutung von ROS und der Bcl-2-Proteine für die Rapamycin-vermittelte Sensitivierung	112
Fazit.....	114
Material und Methoden	116
Zelllinien und Zellkultivierung.....	116
Zelllinien.....	116
Zellkultur – Kultivierung	117
Einfrieren von Zellen	118
Verwendete agonistische Antikörper.....	118
Verwendete Reagenzien	118
Zellbiologische Methoden	119
Durchflusszytometrie.....	119
Oberflächenexpression - Rezeptoren.....	120
Blockierungsexperimente – Rezeptoren	120

Nachweismethoden – Apoptose	121
Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	121
Propidiumjodid-Färbung	122
Hoechstfärbung - Bisbenzimidfärbung	122
Nachweismethode – Zytotoxizität/Nekrose.....	123
Nachweis Proliferation - Wachstumskurven.....	124
Nachweismethode – Zellvitalität.....	124
Nachweismethode – mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)	125
Nachweismethode – ROS (reactive oxygen species)	125
Nachweismethode – Aktivierung von Bax.....	125
Nachweismethode – Bax-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie	126
Proteinanalytik (Westernblot Analyse)	126
Herstellung von Proteinextrakte mit Standard-Lysepuffer	127
Herstellung von Proteinextrakte mit Phospho-Lysepuffer.....	127
Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Methode	128
Elektrophorese-Protokoll.....	129
Protein-Transfer-Protokoll.....	130
Enhanced Chemilumineszenz (ECL).....	130
Verwendete Antikörper: Westernblot Analyse	131
Herstellung von Zellfraktionierungslysaten	131
Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxipräparation)	132
Transiente Transfektion.....	132
siRNS-vermittelte Herunterregulation von SMAC und Bid.....	133
Immunpräzipitation	133
Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	134
Literaturverzeichnis	136
Anhang	158
Klinische Studien zum malignen Melanom	158
Abkürzungsverzeichnis	161
Curriculum Vitae.....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
Publikationsliste	168
Kongressbeiträge.....	169
Danksagung.....	170

Zusammenfassung

Das Auftreten des malignen Melanoms, der aggressivsten Form des Hautkrebses, ist in den letzten Jahrzehnten weltweit dramatisch angewachsen und wächst immer noch schneller als andere Malignitäten. Trotz steigender Inzidenzen werden die Prognosen und Überlebensraten seit den 60iger Jahren immer besser, was nicht zu Letzt an der Früherkennung und der damit verbundenen frühzeitigen chirurgischen Entfernung dünner Tumore liegt. Dessen ungeachtet, ist das metastasierte Melanom immer noch durch eine ungebrochen hohe Mortalität in Verbindung mit auftretenden Therapieresistenzen gekennzeichnet. Bis heute gibt es keine wirklich effizienten Therapien für das maligne Melanom. Die ausgeprägte Resistenz gegen Chemotherapeutika und gegen eine antitumorale Immunantwort ist häufig mit Defekten im proapoptotischen Signalweg gekoppelt. Die Überwindung der Apoptoseresistenz scheint daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für das maligne Melanom zu sein. Todesliganden haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein gewisses Potential für die Krebstherapie gezeigt. Der Todesligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) hat sich unter den Todesliganden als besonders vielversprechend erwiesen, da er in einer Vielzahl von Krebszellen Apoptose induzieren kann, während normalen Zellen weitestgehend unbeeinflusst bleiben. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen zur Überwindung der TRAIL-Resistenz durch verschiedene Signalwegsinhibitoren untersucht. Dies beinhaltete die PI3K-Akt/PKB-mTOR-Inhibitoren Wortmannin und Rapamycin. Neben den Todesliganden und Kinasen haben sich auch Kaliumkanäle als aussichtsreiche therapeutische Ziele herausgestellt, da sie maßgeblich an der Tumorprogression beteiligt sind. Das Triarylmethan TRAM-34, das selektiv den Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanal KCa3.1 inhibiert, wurde daher ebenfalls untersucht. TRAM-34 ist in der Lage die Todesliganden-induzierte Apoptose synergistisch zu verstärken und die Resistenzen gegen TRAIL und den agonistischen CD95-Antikörper (CH-11) in einer Vielzahl von Melanomzelllinien zu überwinden, obwohl TRAM-34 selbst keine Apoptose induziert. Neben der Expression von KCa3.1 -Kanälen in der Plasmamembran, die für das Melanom bereits beschrieben wurde, konnte eine KCa3.1 -Expression auch in der mitochondrialen Membran nachgewiesen werden. Die Inhibition der KCa3.1 -Kanäle durch TRAM-34 führte zu einer Hyperpolarisierung der mitochondrialen Membran und einer frühen Aktivierung von Bax. Genauere Untersuchungen der apoptotischen Signalwege offenbarten eine Hochregulation beider TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5) und eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges. Die Kombination aus TRAM-34 und TRAIL führte zu einer starken Freisetzung der proapoptotischen, mitochondrialen Faktoren Cytochrom C, AIF und SMAC/DIABLO. Der Knockout von Bax und die Bcl-2

Überexpression blockierten die TRAM-34/TRAIL-induzierte Apoptose nahezu vollständig. Neben Bax konnte auch das Gleichgewicht zwischen den IAPs und SMAC/DIABLO als wichtig für die Regulation der TRAIL-Sensitivität nachgewiesen werden. Der siRNA-vermittelte Knockdown von SMAC führte zu einer Blockierung der TRAM-34/TRAIL-induzierten Apoptose, die Überexpression von XIAP zu einer partiellen Apoptoseblockierung. Die synergistischen Effekte von TRAM-34/TRAIL resultierten aus der Aktivierung von Bid durch TRAIL, der Aktivierung von Bax durch TRAM-34 und der massiven Freisetzung von SMAC aus den Mitochondrien durch die Kombination. Ebenso wie Kaliumkanäle, haben sich auch Komponenten des PI3K-Akt/PKB-mTOR-Signalweges als vielversprechende therapeutische Ziele zur Behandlung verschiedener Tumorentitäten erwiesen. Die Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierten Apoptose durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin und den mTOR-Inhibitor Rapamycin erwies sich als Caspasenunabhängig, korrelierte aber mit einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges. Dies konnte durch die unvollständige Prozessierung der Effektorcaspase-3 sowie durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung proapoptotischer Faktoren (Cytochrom C, SMAC/DIABLO und AIF) aus den Mitochondrien gezeigt werden. Die Apoptoseinduktion war entscheidend von Bax abhängig, da der Knockout von Bax und die Bcl-2 Überexpression zu einer vollständigen Blockierung der Apoptose führten. Wortmannin und Rapamycin induzieren selbst keine Apoptose, bewirken aber eine Aktivierung von Bax (Konformationsänderung), die nachgewiesen werden konnte. Die frühe Aktivierung von Bax korrelierte in hohem Maße mit Veränderungen in der charakteristischen Bax-Phosphorylierung. Beide Signalwegs-inhibitoren führten zu einer Abnahme der inaktivierenden Bax-Phosphorylierung an Serin-184 und zu einer deutlichen Verstärkung der aktivierenden Phosphorylierung an Threonin-167. Die Verstärkung der Threonin-167-Phosphorylierung konnte als abhängig von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) nachgewiesen werden. Sowohl Wortmannin als auch Rapamycin führten zu einer vermehrten Produktion von ROS. Obwohl die Signalwege der ROS-vermittelten Apoptoseinduktion nach wie vor weitestgehend unbekannt sind, führte das Antioxidant α -Tocopherol (Vitamin E) zu einer partiell supprimierten Apoptose und einer verminderten Bax-Aktivierung. Dies ging mit einer verringerten Bax-Phosphorylierung an Threonin-167 einher. So wurde ein neuer Mechanismus aufgezeigt, wie ROS Apoptose, über die Beeinflussung der Bax-Phosphorylierung, kontrollieren können. Die hier gezeigten Strategien zur Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose durch die Signalwegs-inhibitoren TRAM-34, Wortmannin und Rapamycin könnten bei der Behandlung des malignen Melanoms helfen, um TRAIL-Resistenzen zu überwinden und die Wirksamkeit TRAIL-vermittelter Therapieformen zu optimieren.

Abstract

The incidence of malignant melanoma, the most aggressive form of skin cancer, has grown dramatically worldwide in recent decades and is still growing faster than other malignancies. Despite increasing incidence, predictions and survival rates have been improving since the 1960s, which can be attributed to early diagnosis and early surgical removal of thin tumors. Nonetheless, the metastatic melanoma is still characterized by an unbroken high mortality in connection with therapy resistance. To date, there are no truly effective therapies for malignant melanoma. The pronounced resistance to chemotherapeutic agents as well as to an anti-tumor immune response is often related to defects in proapoptotic signaling. Overcoming apoptosis resistance therefore appears to be a promising therapeutic goal for malignant melanoma. Death ligands have demonstrated a certain potential for cancer therapy both *in vitro* and *in vivo*. The death ligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) appears to induce apoptosis in a variety of cancer cell lines, while normal cells remain largely unaffected. However, melanoma cells reveal both preexisting and inducible TRAIL resistance. In the present work, mechanisms for overcoming TRAIL-resistance were examined by various signaling pathway inhibitors. These include the inhibitors of the PI3K-Akt/PKB-mTOR pathway wortmannin and rapamycin. In addition to the death ligands and kinases, potassium channels have also emerged as promising therapeutic targets because they are heavily involved in tumor progression. The triaryl methane TRAM-34, which inhibits the Ca²⁺-dependent potassium channel KCa3.1, was therefore also examined.

TRAM-34 is capable of enhancing death ligand-induced apoptosis synergistically and to overcome the resistance to TRAIL and the agonistic CD95 antibody (CH-11) in a variety of melanoma cell lines, although TRAM-34 itself does not induce apoptosis. In addition to the expression of KCa3.1 channels in the plasma membrane, which had previously been described for melanoma, KCa3.1 expression was detected in the mitochondrial membrane. Inhibition of the KCa3.1 channels by TRAM-34 resulted in a hyperpolarization of the mitochondrial membrane and an early activation of Bax. Closer investigations of the apoptotic signaling pathways revealed upregulation of both TRAIL receptors (TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5) and activation of the intrinsic apoptosis pathway. The combination of TRAM-34 and TRAIL led to a strong release of pro-apoptotic, mitochondrial factors cytochrome c, AIF and SMAC/DIABLO. The knockout of Bax and Bcl-2 overexpression blocked the TRAM-34/TRAIL-induced apoptosis almost completely. In addition to Bax the balance between the IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) and SMAC/DIABLO has also been shown to be important for the regulation of TRAIL sensitivity. The siRNA-mediated Knockdown of SMAC resulted in blocking of the TRAM-34/TRAIL-induced apoptosis, overexpression of XIAP to a

partial blockage of apoptosis. The synergistic effects of TRAM-34/TRAIL resulted from the activation of Bid by TRAIL, activation of Bax by TRAM-34 and the massive release of SMAC from the mitochondria by the combination.

As well as potassium channels, components of the PI3K-Akt/PKB-mTOR signaling pathway appear to be promising therapeutic targets for the treatment of various tumors. The present study showed that sensitization of melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis by the PI3K inhibitor wortmannin and the mTOR inhibitor rapamycin proved to be independent of the activation of the caspase cascade, but was correlated with the activation of the mitochondrial apoptosis pathway. This was shown by the incomplete processing of the effector caspase-3 as well as by the loss of mitochondrial membrane potential and release of proapoptotic factors (cytochrome c, SMAC/DIABLO, and AIF). Apoptosis induction was critically dependent on Bax, since the knockout of Bax and Bcl-2 overexpression led to a complete blockage of apoptosis. Wortmannin and rapamycin itself does not induce apoptosis, but resulted in an activation of Bax, as was demonstrated by conformational change of Bax. Early activation of Bax correlated strongly with changes in the characteristic Bax phosphorylation. Both pathway inhibitors resulted in a decrease of the inactivating Bax phosphorylation at serine-184 and to a considerable increase of the activating phosphorylation at threonine-167. The gain of the 167-threonine phosphorylation could be detected as a function of reactive oxygen species (ROS). Both wortmannin and rapamycin led to an increased production of ROS. Although the signaling pathways of ROS-mediated apoptosis are still largely unknown, the addition of the antioxidant α -tocopherol (vitamine E) led to partially suppressed apoptosis and decreased Bax activation. This was accompanied by a decreased Bax phosphorylation at threonine-167. Thus, a new mechanism has been predicted how reactive oxygen species can control apoptosis by influencing the Bax phosphorylation.

The strategies shown here for the sensitization of melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis through the signaling pathway inhibitors TRAM-34, wortmannin and rapamycin could be helpful for the treatment of malignant melanoma to overcome TRAIL resistance and to optimize the efficiency of TRAIL-mediated therapies.

Einleitung

Das maligne Melanom

Epidemiologie und Progression

Das maligne Melanom, die aggressivste Form des Hautkrebses, tritt im Vergleich zu anderen Hauttumorarten relativ selten auf (< 5%), steht aber mit 80% aller Hauttumor-assoziierten Todesfälle in Beziehung (Dahl und Guldberg, 2007; Kuphal und Bosserhoff, 2009). Das Auftreten des Melanoms ist im letzten Jahrzehnt weltweit dramatisch angewachsen und wächst immer noch schneller als andere Malignitäten. In der europäischen Union nahmen Melanomerkrankungen in den letzten 50 Jahren um das 15-fache zu, was einem jährlichen Anstieg von 3-7% entspricht (de Braud et al., 2003). Trotz steigender Inzidenzen beim Melanom, werden Prognosen und Überlebensraten seit den 60iger Jahren immer besser, was nicht zu Letzt an der Früherkennung und der damit verbundenen frühzeitigen chirurgischen Entfernung dünner Tumore liegt (Gremel et al., 2009; Bandarchi B et al., 2010). Es gilt aber weiterhin, dass Patienten mit einem fortgeschrittenen oder metastasierendem Melanom extrem schlechte Prognosen haben. Laut einer Tumorstatistik des National Cancer Institute (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/) nimmt die 5-Jahres Überlebensrate dramatisch von etwa 99% für lokale Tumore auf nur 16% in Patienten mit Metastasen ab (Gremel et al., 2009).

Melanome entstehen durch maligne Entartung, d.h. durch Transformation und Proliferation von Melanozyten. Melanozyten sind die Pigmentproduzierenden Zellen, die in der basalen Zellschicht der Epidermis zu finden sind. Primäre Melanome können also entweder aus Vorläufer-Läsionen (melanotischen Präkanzerosen, Nävusdysplasien oder angeborenen Muttermalen) oder direkt als Neubildungen entstehen (de Braud et al., 2003; Dahl und Guldberg, 2007; Bandarchi et al., 2010). Die Initiierung und Progression des Melanoms wird von einer Reihe histologischer Veränderungen begleitet, die mit dem 5-stufigen Clark-Modell (Clark, 1991) beschrieben werden. Stadium 1 umfasst Nävi, gutartige Läsionen, die durch eine vermehrte Anzahl von verschachtelten Melanozyten charakterisiert sind. Stadium 2 beschreibt fehlgebildete (dysplastische) Nävi, die sich durch zufällige, atypische zytologische Veränderungen auszeichnen. Stadium 3 beschreibt Melanome in der radialen Wachstumsphase (**radial growth phase - RGP**), in der die Zellen lokal invasiv sind und die Dermis nur vereinzelt infiltrieren. In der sich anschließenden vertikalen Wachstumsphase (**vertical growth phase - VGP**; Clark-Stadium 4) infiltrieren Melanomzellen in Form von Clustern die Dermis und die subkutane Fettschicht und entfalten metastasierende

Eigenschaften. Fernmetastasen stellen hierbei den letzten Schritt dar (Clark-Stadium 5; Abb. 1; (Clark, 1991; Dahl und Guldborg, 2007; Gremel et al., 2009). Melanomzellen können lokal die Lymphknoten infiltrieren oder Fernmetastasen im Gehirn, der Lunge, der Leber und den Knochen bilden.

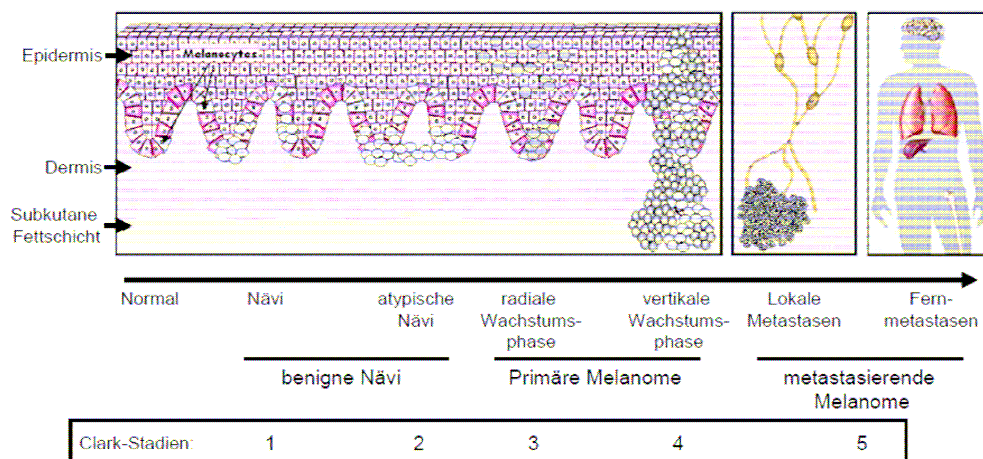


Abbildung 1: Stadien der Melanomprogression.

Melanocyten sind an der basalen Seite der Epidermis zu finden. Wenn Melanocyten proliferieren entstehen Nävi. Atypische Nävi mit einer atypischen Struktur weisen aber immer noch zytologisch normale Melanocyten auf. Während die Zellen in der radialen Wachstumsphase (Stadium 3) eher die Epidermis infiltrieren, durchdringen sie in der vertikalen Wachstumsphase die Dermis und die subkutane Fettschicht (Stadium 4) bevor sie dann metastasieren (Stadium 5) (verändert nach Gremel et al., 2009).

Die Bildung eines Melanoms wird durch exogene (umweltbedingte) und endogene Risikofaktoren begünstigt. Hierzu gehören ein heller Hauttyp (Hauttyp I und II), eine hohe Sonnenexposition (hauptsächlich UV-B Strahlung) sowie mehrere starke Sonnenbrände in der Kindheit, eine hohe Anzahl von Nävi, familiäre Dispositionen, Immunsuppression und ein höheres Lebensalter (de Braud et al., 2003; Bandarchi et al., 2010; Pacheco et al., 2011). Dennoch sind etwa 65% aller Melanome auf intensive Sonnenexposition zurückzuführen. Charakteristisch für das maligne Melanom ist, neben der hohen Mortalität im metastasierten Stadium, auch die Apoptose- und Chemotherapeutikaresistenz. Diese Faktoren ermöglichen das Auftreten von Fernmetastasen auch Jahre nach Entfernung des Primärtumors (Garbe und Leiter, 2009).

Klinische Charakteristika des Melanoms und Arten des Melanoms

Die Nationalen Institute für Gesundheit (National Institutes of Health, NIH) entwickelten ein einfaches System, die sogenannten ABCD-Kriterien, um möglichst frühzeitig veränderte Läsionen zu diagnostizieren und die Entwicklung von Melanomen zu verhindern (Masci und Borden, 2002; de Braud et al., 2003). Die Kriterien sind:

A) Asymmetry - Asymmetrie: Das Melanom lässt sich nicht durch eine Spiegelebene in zwei gleiche Hälften teilen (Abb. 2A).

B) Border irregularity - unregelmäßige Begrenzung: Die Ränder des Melanoms sind unregelmäßig und gezackt (Abb. 2B).

C) Color variability - Farbveränderungen: Keine einheitliche Färbung; es treten rot, braun, schwarz, bläuliche oder auch ungefärbte Bereiche auf (Abb. 2C).

D) Diameter - Durchmesser: Der Durchmesser des Melanoms beträgt mehr als 5 mm oder hat sich in kurzer Zeit stark vergrößert (Abb. 2D).

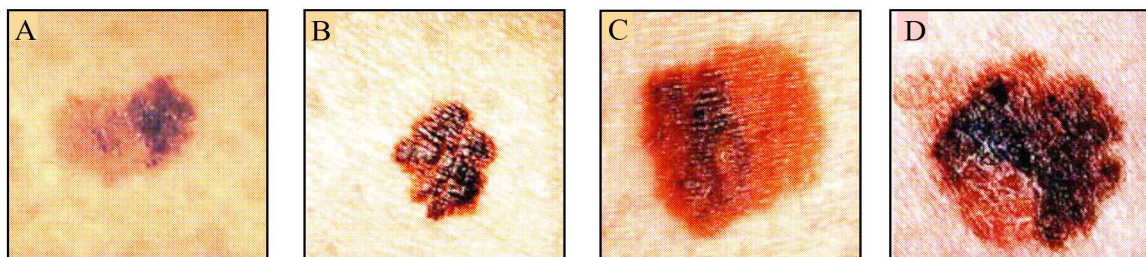


Abbildung 2: Die ABCD-Kriterien beim malignen Melanom.

(A) Asymmetrie: Das Mal besitzt keine einheitliche Form.

(B) Begrenzung: Die Begrenzung des Mals ist unscharf und verwaschen.

(C) Farbe: Es können mehrere Farbtöne innerhalb eines Mals auftreten.

(D) Durchmesser: Das Mal ist > 5 mm oder in der letzten Zeit gewachsen.

Neben diesen Kriterien erfolgt zusätzlich eine Gliederung des Melanoms in vier Haupttypen (de Braud et al., 2003; Bandarchi et al., 2010):

1. Superfiziell Spreitendes Melanom (SSM)

Dieses stellt die häufigste Form des malignen Melanoms dar. Die Läsion ist stark pigmentiert und anfangs flach. Sie wächst asymmetrisch und ungleichmäßig. In den späteren Phasen wird die Läsion zu einem asymmetrischen Flecken mit klar geformten Rändern und einer ungleichmäßigen Färbung. Diese Melanome können sehr langsam und über Jahre wachsen.

2. Noduläres Melanom (NM)

Das NM präsentiert sich als Knoten mit einer scharfen Abgrenzung zur umliegenden Haut und einer dunkleren, eher einheitlichen Färbung. Diese Läsion ist durch ein frühes vertikales Wachstum mit schneller Invasion in die Dermis gekennzeichnet. Diese Läsionen treten häufiger bei Männern auf, sind überwiegend am Rumpf, Kopf und Nacken zu finden und sind relativ aggressiv.

3. Lentigo malignes Melanom (LMM)

Diese Variante tritt an sonnenexponierten Hautstellen wie dem Gesicht und den oberen Extremitäten, vor allem bei älteren Patienten, auf. Das LMM entwickelt sich aus einer linsenförmigen malignen Läsion, auch Hutchinson-Flecken genant, nur bei etwa 5% der Patienten. Es ist durch ein langsames Wachstum charakterisiert und metastasiert infolgedessen nur in seltenen Fällen. Kennzeichnend ist eine große, braun-schwarze Läsion.

4. Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Diese Form tritt an den Akren (Hände, Füße oder unter den Nägeln) auf, neigt zu Ulzeration und ist selten bei hellhäutigen Menschen zu finden. Aber etwa 35% aller Melanome die sich bei dunkelhäutigen, lateinamerikanischen und asiatischen Menschen ausbilden sind ALMs.

5. Seltene Melanomformen

Hierzu zählen das Uvea-Melanom, welches in der pigmenttragenden Schicht der mittleren Augenhaut (Uvea) entsteht, das Schleimhaut-Melanom, welches im Mund, im Genitalbereich, dem Respirations- oder dem Gastrointestinaltrakt auftreten kann, das neurotrope Melanom, eine großflächige Läsion im Kopf- und Nackenbereich, die sich durch atypische Melanozyten und Melan-A Negativität auszeichnet. Andere seltene Varianten umfassen das Amelanotische Melanom, das in etwa dem NMM entspricht, wobei jedoch wegen der Entartung der Zellen kein Pigment mehr gebildet wird. Dies macht es besonders tückisch, weil es erst sehr spät entdeckt wird und dann oft schon metastasiert hat. Zusätzlich gibt es noch das polypoide Melanom. Es hat eine blumenkohlartige Gestalt und wächst zum größten Teil über die Oberfläche der Epidermis hinaus. Häufig ist es auf dem Rücken lokalisiert.

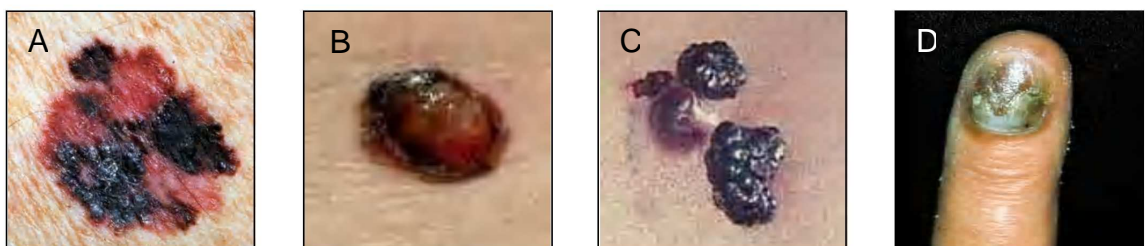


Abbildung 3: Unterteilung des Melanoms in mehrere Haupttypen.

- (A) Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)
- (B) Noduläres Melanom (NM)
- (C) Lentigo malignes Melanom (LMM)
- (D) Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Einteilung der Stadien und Prognose

Zur histologischen Klassifikation der Stadien eines malignen Melanoms berücksichtigt man die Tumordicke, die Invasionsstiefe des Primärtumors in die Dermis und die Metastasierung. Folgende Parameter werden zur Tumorcharakterisierung herangezogen:

1. Tumordicke nach Breslow. Hierzu wird die absolute Dicke des Tumorgewebes von der Granularzellschicht (*Stratum granulosum*) der Epidermis bis zum tiefsten noch nachweisbaren Tumorgewebe gemessen (Breslow, 1970).
2. Invasionslevel nach Clark. Hierzu wird die Eindringtiefe des Tumors in die verschiedenen Schichten der Haut bestimmt (Clark et al., 1969).

Level I:	In situ: Alle Tumorzellen befinden sich oberhalb der Basalmembran, innerhalb der Epidermis.
Level II:	Überschreitung der Basalmembran, Invasion in die Papillenschicht (<i>Stratum papillare</i>) der Dermis
Level III:	Invasion bis an die Grenze zur Netzschicht (<i>Stratum reticulare</i>) der Dermis
Level IV:	Invasion in die Netzschicht
Level V:	Invasion in das subkutane Fettgewebe

3. TNM-Klassifikation nach Harmer und Denoix. T steht für Tumor und beschreibt die Ausdehnung und das Verhalten des Primärtumors; N steht für die Lymphknoten (engl. nodes) und das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen; M steht für Metastasen und somit für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (Harmer et al., 1970).

Im Allgemeinen gilt: Je dicker der Tumor und je mehr Lymphknoten- oder Fernmetastasen, desto höher wird das Stadium eingestuft. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist maßgeblich vom Stadium abhängig. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem kleinen Primärtumor (< 1,0 mm) bei 95% liegt, reduziert sie sich bei Fernmetastasen bis auf 18% (nach dem American joint committee on Cancer (AJCC), Melanoma Staging, 2002).

Melanomtherapie bis heute

Die Früherkennung des malignen Melanoms ist von entscheidender Bedeutung. Bei kompletter operativer Entfernung des Primärtumors im Stadium I ergibt sich für die betroffenen Patienten eine Überlebensrate von über 90%. Im fortgeschrittenen Stadium kann es zur Metastasierung in verschiedenen Organen wie Lunge, Leber, Knochen oder

Gehirn kommen, was die Möglichkeiten einer operativen Entfernung stark einschränkt (Gremel et al., 2009). Die schlechte Prognose für die Überlebensrate und die geringe Ansprechrate auf konventionelle Chemotherapeutika beruhen beim metastasierten Melanom auf einer Therapie-Resistenz, die in Verbindung mit Defekten in der proapoptotischen Signalkaskade steht. Die Chemotherapieresistenz wird mit drei verschiedenen molekularen Veränderungen im Apoptosesignalweg in Zusammenhang gebracht:

- (1) Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren (Soengas und Lowe, 2003)
- (2) Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren (Soengas und Lowe, 2003)
- (3) Reaktivierung von Überlebenssignalen (Eberle et al., 2007a).

Bis zum Jahr 2011 gab es nur drei Substanzen zur Behandlung des metastasierten Melanoms, die von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA = Food and Drug Administration) zugelassen waren:

- (1) Dacarbazin (DTIC), zugelassen 1975
- (2) Hochdosiertes Interleukin-2 (IL-2) zur Immuntherapie, zugelassen 1998
- (3) Ipilimumab (anti-CTLA-4-Antikörper), zugelassen 2011.

Häufig wird auch Interferon-alpha (IFN- α) zur Therapie eingesetzt, oder aber eine Kombination aus IL-2 und IFN- α . Leider zeigten sich sowohl bei der Behandlung mit DTIC als auch mit IL-2 und/oder IFN- α nur geringe Ansprechraten, verbunden mit hohen Nebenwirkungen und keinem Effekt auf das Gesamtüberleben (OS, engl.: overall survival) (Mouawad et al., 2010; Pacheco et al., 2011). Die geringe Effektivität herkömmlicher Therapien verdeutlichte die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer, wirksamer Substanzen und Strategien. In den letzten Jahren gab es mehrere hoffnungsvolle Therapieansätze (Pacheco et al., 2011; Blank et al., 2011; Lipson und Drake, 2011; Nikolaou et al., 2012). Ein weitläufiges Feld der Therapiestrategien stellt die Inhibition von Signalkaskaden dar, so zum Beispiel die Inhibition der Rezeptortyrosinkinase (RTK) c-KIT. Die Aktivierung von c-Kit führt zur Stimulation des MAPK (Mitogenaktivierte Proteinkinasen)-, des PI3K-Akt/PKB- und des JAK-STAT Signalweges. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden Kit Mutationen, Amplifikationen und Kit Aberrationen in 11 bis 39% der akralen, mukosalen und CSD-Melanome (chronisch Sonnen-geschädigt, engl.: chronic sun-damaged) nachgewiesen. Studien mit Imatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor der gegen Bcr-Abl, c-Kit und PDGFR gerichtet ist, konnten bessere Ansprechraten, ein verlängertes progressionsfreies Überleben (sechs Monate), einen Tumorrückgang und ein besseres Gesamtüberleben (ein Jahr; 51% der Patienten) zeigen (Nikolaou et al., 2012). Die Inhibition des Ras/Raf/MEK/ERK Signalweges ist ein weiteres Erfolg versprechendes

Therapiefeld, denn der Ras-Signalweg hat viel Aufmerksamkeit im Melanom erregt. Die Signalkaskade unterstützt unter anderem das Überleben der Zellen, die Proliferation und die Invasion durch zwei verschiedene Signalwege, den MAPK- und den PI3K-Akt/PKB-Signalweg. N-Ras ist in bis zu 20% der Melanome mutiert, was zu einem konstitutiv aktiven Signalweg führt. Und obwohl Ras als ideales therapeutische Ziel für die Behandlung des Melanoms und anderer Tumorarten angesehen wurde, haben Phase II Studien mit Ionafarnib, einem Farnesyltransferase-Inhibitor, der die posttranslationale Franesylierung und damit die Translokation von Ras an die Plasmamembran unterbindet, als Monotherapie keine eindeutigen Ergebnisse gebracht. Allerdings wurde darauf verwiesen, dass die Inhibition von Ras die Effektivität von anderen Behandlungsmethoden (Cisplatin, Sorafenib) synergistisch verstärken kann (Nikolaou et al., 2012). Das am häufigsten mutierte Onkogen im Melanom ist BRAF, denn bis zu 60% aller Melanome weisen eine aktivierende Mutation in BRAF (BRAF^{V600E}) auf. Studien mit selektiven BRAF-Inhibitoren (z.B.: PLX4032/ Vemurafenib) zeigten in Phase I Studien ein 80%-iges Ansprechen auf Vemurafenib und in Phase III Studien ein erhöhtes OS (sechs Monate, 84% der Testpersonen) und ein verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Dacarbazin (Flaherty et al., 2010; Pacheco et al., 2011; Nikolaou et al., 2012). Neben selektiven BRAF-Inhibitoren haben auch selektive Inhibitoren gegen MEK-Kinasen (z.B. AZD6244) vielversprechende Wirkungen in Patienten mit metastasiertem Melanom gezeigt. Ein großer Nachteil bei allen Kinaseinhibitor-Therapien liegt in der Resistenzentwicklung gegen die spezifischen Inhibitoren durch die Aktivierung andere Signalwege, wie zum Beispiel dem PI3K-Akt/PKB-Weg und in der recht aufwendigen Bestimmung des Mutationsstatus der einzelnen Patienten (Blank et al., 2011). Andere Therapiestrategien beschäftigen sich mit der Wiederherstellung der Funktion von Tumorsuppressoren wie PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog auf Chromosom 10) durch die Verwendung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) oder mit der gezielten Blockierung antiapoptotischer Proteine (Bcl-2, Mcl-1) durch niedermolekulare Substanzen (engl.: small-molecule inhibitors) wie Obatoclax (Mcl-1 Inhibitor) und ABT-737 (Bcl-2 Inhibitor). Weitere hoffnungsvolle Therapieansätze eröffnen sich bei der Blockierung der Tumorangio-genese mit spezifischen Antikörpern wie Bevacizumab (gegen VEGF-A, engl.: vascular endothelial growth factor A) oder Axitinib (gegen die VEGF-Rezeptoren und PDGF-Rezeptoren, engl.: platelet derived growth factor receptor) und in der Immuntherapie (Blank et al., 2011; Nikolaou et al., 2012). Am effektivsten haben sich Ipilimumab (ein Antikörper gegen das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4)) und der Antikörper gegen PD-1 (eng.: Programmed death-1) gezeigt. In diesem Bereich bewegt sich auch die adaptive Tumormimmuntherapie, bei der polyklonale T-Zellen (tumorinfiltrierende Lymphozyten) aus dem Tumorgewebe entnommen, *in vitro* mit

hohen Dosen IL-2 stimuliert und dem Patienten zurückgegeben werden (Rosenberg et al., 2011). Eine tabellarische Aufstellung der gezielten Therapieansätze in klinischen Studien im Melanom (Quelle: [www. Clinicaltrials.gov](http://www.Clinicaltrials.gov), (Nikolaou et al., 2012)) ist im Anhang (S.156/157) zu finden.

Der programmierte Zelltod - Apoptose

Das Wort Apoptose stammt von dem altgriechischen Wort *αποίπτειν* = *apopiptein* ab, was „abfallen“ bedeutet. Carl Vogt, ein Naturforscher, entdeckte 1842 beim Studium der Entwicklung von Kaulquappen als Erster die Apoptose (Vogt, 1842). Über 100 Jahre später wurde aber erst die Bedeutung dieser Entdeckung erkannt und 1972 wurde der Begriff Apoptose von Kerr und Kollegen geprägt. In der Biologie wird der Begriff Apoptose gebraucht, um das Absterben von Zellen nach einem definierten Programm zu beschreiben, daher spricht man auch von programmiertem Zelltod (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). Apoptose ist ein evolutionär hoch konservierter Mechanismus mit einer essenziellen Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, für die Entwicklung von Immunzellen und in der Embryogenese (Koolman und Röhm, 1998; Brenner et al., 2008). Die Apoptose ist ein aktiver, ATP-abhängiger und strikt regulierter biochemischer Prozess, der gewährleistet, dass Zellen ohne Schädigung des Nachbargewebes zu Grunde gehen. Jede Zelle des menschlichen Körpers verfügt über die Möglichkeit Apoptosesignalwege zu aktivieren und sich so aus dem Zellverbund zu entfernen (altruistischer Zelltod).

Apoptose wird durch verschiedene morphologische und biochemische Veränderungen definiert, die von einer Familie von Proteasen (Caspasen) vermittelt werden. Morphologische Auffälligkeiten sind das Schrumpfen der Zellen, die Fragmentierung der DNS durch Endonukleasen und die Chromatin-Kondensation, wobei die Integrität der Membran erhalten bleibt. Auch die Zellmembran unterliegt Veränderungen während des apoptotischen Prozesses, denn es kommt zur Abschnürung von exozytotischen Membranvesikeln, die Zellfragmente enthalten, von der Plasmamembran. Diese werden als apoptotische Körperchen (engl.: apoptotic bodies) bezeichnet. Makrophagen und andere phagozytierenden Zellen nehmen die Zellreste durch Phagozytose auf und verhindern eine inflammatorische Antwort, da keine zytosolischen Bestandteile in den extrazellulären Raum gelangen können (Hengartner, 2000; Johnstone et al., 2002; Harada und Grant, 2003; Tait und Green, 2010a). Die Dysregulation der Apoptose spielt bei verschiedenen Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson kommt es häufig zu Veränderungen, die zu einer verstärkten

Apoptose führen. Ein Fehlen von Apoptose in der Entwicklung von Lymphozyten kann zu Autoimmunerkrankungen führen (Goldin und Landgren, 2009). Zusätzlich ist der Zusammenhang zwischen Suppression der Apoptose und maligner Transformation von Zellen eindeutig belegt (Vermeulen et al., 2005). Die Hemmung von Apoptosesignalwegen kann entweder durch inaktivierende Mutationen proapoptotischer Gene oder durch Überexpression antiapoptotischer Faktoren geschehen. Die so veränderten Zellen entziehen sich sowohl der Selbstkontrolle als auch der Kontrolle durch das Immunsystem (Igney und Krammer, 2002; Kim et al., 2005). Apoptosedefizienz in malignen Tumoren kann von grundlegender Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika, Chemotherapeutika und immuntherapeutischen Ansätzen sein (Eberle et al., 2007b; Fulda, 2009b).

Andere Formen des Zelltods- *Nekrose, Nekroptose und Autophagie*

Im Unterschied zur Apoptose führt die Nekrose in der Regel zu umfassenden Zellschäden, bei denen die Membranintegrität zerstört wird. Nekrose führt zum Anschwellen und Platzen der geschädigten Zellen (Abb. 4) und löst so eine inflammatorische Reaktion aus. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose kein energieabhängiger Prozess. Auslöser für einen nekrotischen Zelltod können mechanische Verletzungen, die Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie) oder eine Bakterieninfektion der Zelle sein (Leist und Jaattela, 2001). Aber auch Apoptoseinduktion ohne ausreichende Energieversorgung kann zu Nekrose führen (Fink und Cookson, 2005).

Der Begriff Nekroptose bezieht sich auf eine Form der programmierten, regulierbaren Nekrose. Nekroptose wird durch zwei Phasen charakterisiert: eine Signalphase und eine zelluläre Zersetzungsphase. Die Initiierung der programmierten Nekrose durch Todesrezeptoren rekrutiert RIP1 und RIP3 (**R**eceptor-**i**nteracting **p**rotein) an den Rezeptorkomplex. Die Serin-Threonin Kinase-Aktivität der RIPs ist essenziell für diesen nekrotischen Signalweg. Die Ausführung der Nekroptose beinhaltet die aktive Zersetzung der mitochondrialen und lysosomalen Membran sowie der Plasmamembran. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS, engl.: reactive oxygen species), die im mitochondrialen Komplex I produziert werden, haben einen großen Anteil an der Ausführung der Nekroptose.

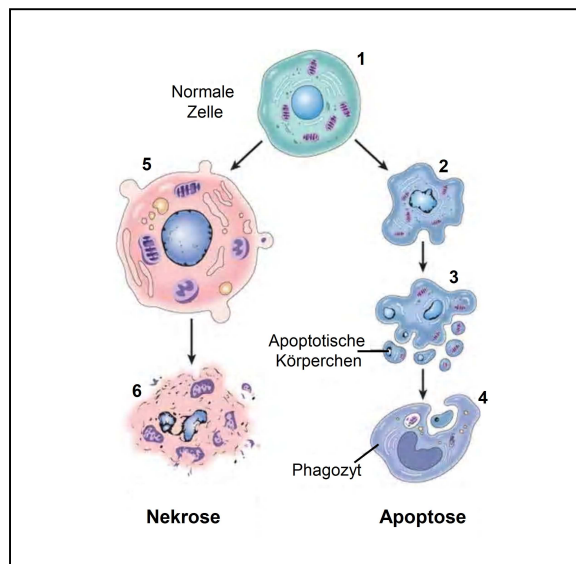


Abbildung 4: Vergleich zwischen einer apoptotischen (rechts) und nekrotischen (links) Zelle.

Im Zuge der Apoptose kommt es in normale Zellen (1) zu einer Chromatinkondensation (2), zur Zellschrumpfung und zur Abschnürung apoptotischer Körperchen (3) die dann durch Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden (4). Bei der Nekrose Schwellen die Zellen an, die Zellmembran bricht auf (5) und letztendlich kommt es zum Platzen der Zellen (6) was eine Entzündungsreaktion hervorruft (verändert nach Kerr, 1995).

Nekroptose spielt in der Pathogenese verschiedener Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen und viralen Infektionen, eine entscheidende Rolle (Vandenabeele et al., 2010; Vanden Berghe et al., 2010; Christofferson und Yuan, 2010).

Der Begriff Autophagie beschreibt einen zellulären Recycling-Mechanismus, der alte oder dysfunktionelle Proteine und Organellen entfernt. Autophagie ist essenziell für das Überleben von Zellen, die metabolischem Stress ausgesetzt sind. Der autophagische Prozess ist in verschiedene Phasen eingeteilt, die von den Proteinen der Atg-Familie (Atg, engl.: **autophagy-related**) kontrolliert werden. In der initialen Phase bildet sich das Autophagosom in vier Schritten (Induktion, Nukleation, Ausdehnung (engl.: **elongation**) und Komplettierung) aus. Anschließend fusioniert das Autophagosom mit den Lysosomen zu einem Autolysosom. In einem finalen Schritt werden die inneren Membranen und die autolysosomalen Inhalte wie Organellen durch lysosomale Enzyme degradiert. Der mTORC1 (mTORC1, engl.: **mammalian target of rapamycin complex 1**) spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle dieses Signalweges. Der mTORC1 verbindet den PI3K-Signalweg mit dem zellulären Nährstoff-Status und dem Energiestatus der Zelle, der von der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) reguliert wird. Der aktivierte mTORC1 blockiert den autophagischen Signalweg durch die Phosphorylierung eines Autophagie-Protein-Komplexes, der wiederum die nachfolgende Autophagie-Kaskade inhibiert.

Signalwege der Apoptose

Die Aktivierung proapoptotischer Signalwege hat weitreichende Konsequenzen für das Schicksal einer Einzelzelle und das des betroffenen Gewebes und ist daher mehrfach abgesichert und gegenreguliert. Abhängig vom proapoptotischen Reiz, der auf die Zelle einwirkt, können unterschiedliche Signalwege aktiviert werden, die im Wesentlichen in zwei verschiedene Apoptosewege münden. Man unterscheidet zwischen dem extrinsischen Signalweg, der über Todesrezeptoren wie TNF- α (**T**umor-**N**ekrose-**F**aktor-**a**lpha), TRAIL (**T**NF-related **a**poptosis-inducing **l**igand) oder CD95 (**C**luster of **D**ifferentiation **95**) läuft, und dem intrinsischen Signalweg, der durch zellulären Stress wie DNS-Strangbrüche und p53 induziert wird und zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt (Fulda und Debatin, 2006; Tait und Green, 2010b). Beide Signalwege sind über das Bcl-2-Protein Bid (**B**H3-interacting **d**omain death agonist) miteinander verbunden und können sich so gegenseitig beeinflussen (Youle und Strasser, 2008). Die finalen Schritte beider Signalwege beinhaltet die Aktivierung von Proteasen und die Spaltung von Todessubstraten, die zum Absterben der Zelle führen (Fischer et al., 2003; Riedl und Shi, 2004)(Abb.5).

Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Todesliganden (CD95L, TRAIL oder TNF- α) an die entsprechenden Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (CD95, TRAIL-R1, -R2 oder TNF-R1) induziert. Dies kann zur Aktivierung der Caspasensignalkaskade führen (Wang und El Deiry, 2003; Lavrik et al., 2005; Krammer et al., 2007). Neben der Aktivierung der Caspasensignalkaskade kann es auch zu der Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen durch die Anlagerung von anderen Adapterproteinen an den zytoplasmatischen Teil der Todesrezeptoren kommen (Di Pietro und Zauli, 2004). Durch Bindung der Todesliganden an ihre Rezeptoren kommt es zu einer Oligomerisierung der Todesrezeptoren und intrazellulär zu der Ausbildung des DISC (engl.: **D**eath **I**nducing **S**ignaling **C**omplex), eines proapoptotischen Multiprotein-komplexes, in dem die Initiatorcaspasen-8 und -10 aktiviert werden (Krammer et al., 2007). Dies geschieht in einem autokatalytischen Prozess, bei dem die Procaspase-8 und -10 über das Adapterprotein FADD (engl.: **F**as-associated **d**eath **d**omain protein) an die zytoplasmatische Todesdomäne des Todesrezeptors binden (Nunez et al., 1998; Wang et al., 2005). Die aktivierten Initiatorcaspasen können in Typ I-Zellen (z.B. Lymphozyten) direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen führen, was zur Spaltung von Todessubstraten wie ICAD (engl.: **I**nhibitor of **C**aspase **A**ctivated **D**Nase) oder PARP (engl.: **P**oly-(**A**D**P**-ribose)-

polymerase) und letztendlich zur Fragmentierung der DNS führt. PARP ist ein Kernprotein, das im DNS-Reparatursystem eine Rolle spielt und direkt über Caspase-3 gespalten und inaktiviert werden kann (Nunez et al., 1998; Wang et al., 2005; Vermeulen et al., 2005). In Typ II-Zellen (z.B. Melanozyten) wird das Signal durch die Spaltung von Bid zu tBid (engl.: truncated **Bid**) an der Mitochondrienmembran amplifiziert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Fischer et al., 2003).

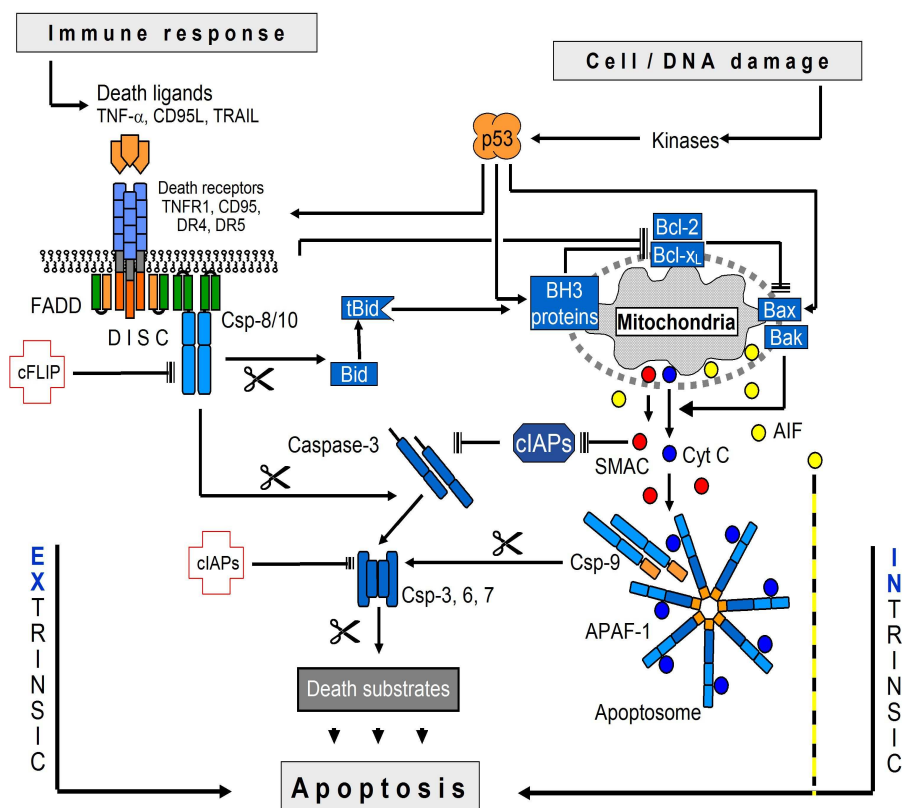


Abbildung 5: Hauptsignalwege der Apoptose

Gezeigt sind der extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg. Die Spaltung und folglich die Aktivierung von Caspasen ist durch das Scherensymbol gekennzeichnet (verändert nach Eberle et al., 2007)

Der intrinsische Signalweg

Bei dem intrinsischen oder auch mitochondrialen Apoptosesignalweg sind die Mitochondrien von zentraler Bedeutung. Die Mitochondrien erfüllen eine doppelte Funktion in der Regulation von Zelltod und Überleben der Zelle. Zum einen sind sie die Kraftwerke der Zelle, zuständig für die Energieproduktion und daher lebensnotwendig für die Zelle. Zum anderen sind sie die Pforte für den intrinsischen Signalweg (Kroemer et al., 2007; Fulda, 2010). Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch verschiedene intrazelluläre Signale wie Zell- oder DNS-Schäden, Hypoxie, Behandlung mit Chemotherapeutika oder durch Interaktion mit dem extrinsischen Signalweg (Ziegler

und Kung, 2008; Tait und Green, 2010b). Hierbei kommt es zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, engl.: **m**itochondrial **o**uter **m**embrane **p**ermeabilisation) und zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ und der damit verbundenen Freisetzung von proapoptotischen Faktoren (Cytochrom C, SMAC, AIF) aus den Mitochondrien ins Zytoplasma (Gonzalvez und Ashkenazi, 2010). Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die Permeabilität der Membran und folglich die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges (Green und Kroemer, 2004). Freigesetztes Cytochrom C bindet an den monomeren Faktor Apaf-1 (engl.: **a**poptotic **p**rotease-**a**ctivating **f**actor-**1**), dies führt zu einer Oligomerisierung und zusammen mit Caspase-9 zur Bildung des Apoptosoms. Die Ausbildung des Apoptosoms führt zur Aktivierung der Caspase-9, die daraufhin die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) spaltet und aktiviert (Riedl und Shi, 2004; Chipuk et al., 2010). Die Freisetzung von Cytochrom C gilt aufgrund der dafür notwendigen Porenbildung als irreversibler Schritt (Tait und Green, 2010b).

Neben Cytochrom C werden auch SMAC (engl.: **S**econd **m**itochondrial **a**ctivator of caspases) und AIF (engl.: **A**poptosis-**i**nducing **f**actor) aus den Mitochondrien freigesetzt. SMAC unterstützt die Caspasen-abhängige Apoptose durch Blockierung der Aktivität von physiologischen Caspaseinhibitoren, den sogenannten cIAPs (engl.: **c**ellular **i**nhibitor of **a**poptosis **p**roteins) (Fulda und Vucic, 2012). AIF, ebenso wie Endonuklease G, werden als Ursache für eine Caspasen-unabhängige Apoptose aufgeführt, die immer wieder kritisch und kontrovers diskutiert wird. AIF ist eine Endonuklease, die unter physiologischen Bedingungen im Intermembran-Raum der Mitochondrien lokalisiert ist und dort als NADH-Oxidase in der Elektronentransportkette mitwirkt. AIF katalysiert die Caspasen-unabhängige Apoptose nach Translokation in den Nukleus durch Chromatin-Kondensation und Fragmentierung der DNS (Norberg et al., 2010). Entscheidend ist, dass der mitochondriale Apoptosesignalweg als Angriffspunkt für verschiedene Therapiestrategien von großer Bedeutung ist (Abb.5)(Wen et al., 2013).

Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Regulation der Apoptose beruht auf der Wechselwirkung zwischen den pro- und antiapoptotischen Signalwegen, die besonders abgesichert und durch die Familie der Bcl-2 Proteine kontrolliert wird (Eberle et al., 2007b). Nach der Erstbeschreibung von Bcl-2 (engl.: **B**-cell **l**ymphoma-**2**) durch Tsujimoto im Jahr 1984 (Tsujimoto et al., 1984) konnte eine Reihe von Proteinen auf der Grundlage von strukturell ähnlichen und konservierten Bereichen, den BH (engl.: **B**cl-2 **h**omology)-Domänen und ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2

identifiziert und klassifiziert werden. Die Proteine der Bcl-2-Familie haben bis zu vier konservierte BH- Domänen (BH1-BH4), über die eine Protein-Protein-Interaktion stattfinden kann (Kim et al., 2006b; Chipuk et al., 2010). Prinzipiell kann die Familie der Bcl-2-Proteine in zwei Gruppen gegliedert werden:

- (1) antiapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 (engl.: **myeloid cell leukemia sequence 1**) und A1/Bfl-1 sowie
- (2) proapoptotische Bcl-2-Proteine.

Die proapoptotische Gruppe der Bcl-2 Proteine lässt sich noch einmal unterteilen in proapoptotische Multidomänen-Proteine wie Bax (engl.: **Bcl-2 associated X protein**), Bak (engl.: **Bcl-2 homologous antagonist killer**), Bcl-x_S (engl.: **Bcl-2-like 1 short**) und Bcl-x_{AK} (engl.: **Bcl-2-like 1 atypical killer**) und die große Gruppe der BH-3-only-Proteine wie Bid, Bim, 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**) (Abb.6) (Hossini und Eberle, 2008; Kelly und Strasser, 2011). Die BH3-only Proteine sind die Schlüssel zur Apoptosekontrolle, da sie die direkten Gegenspieler der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine sind. Nach einem apoptotischen Stimulus und der Aktivierung der BH3-only Proteine binden diese an die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine, neutralisieren deren Aktivität und sorgen für die Freisetzung von Bax und Bak.

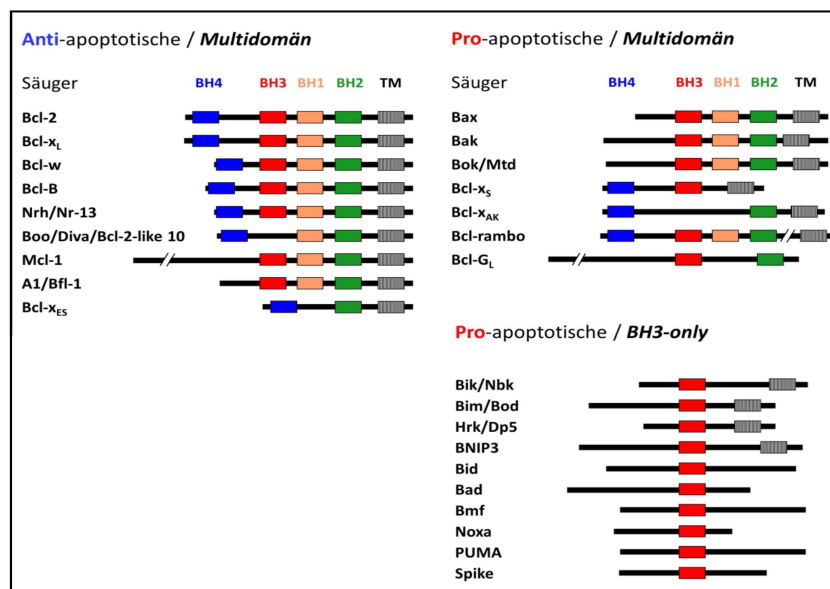


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Familie der Bcl-2-Proteine.

Dargestellt sind die Gruppen der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Die Gruppe der proapoptotischen Bcl-2-Proteine lässt sich noch einmal in die Gruppe der Multidomänen-Proteine und die der BH-only Proteine unterscheiden. Zusätzlich sind die BH-Domänen (BH1-4) sowie die Transmembrandomäne (TM) gekennzeichnet (Eberle und Hossini, 2008).

Die Interaktion von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen läuft über die Bindung der BH3-Domäne (einer amphipathischen α -helix) an eine hydrophobe Tasche der antiapoptotischen Proteine. Die BH1, BH2 und BH3 Domänen der antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder falten sich zu einer kugelförmigen Domäne mit einer hydrophoben Tasche („Bcl-2-Kern“). Die BH4-Region stabilisiert die BH1-BH3-Regionen (Adams und Cory, 2007; Eberle und Hossini, 2008; Chipuk et al., 2010). Der große Unterschied zwischen den multidomän-anti- und proapoptotischen Proteinen liegt in der strukturellen Begebenheit des Bcl-2-Kerns, d.h. in der Taschengometrie, der Aminosäuren-Zusammensetzung und dem Grad der Blockierung der hydrophoben Tasche durch die C-terminale Transmembran-Domäne, die die Interaktion mit den BH3-only Proteinen moduliert (Chipuk et al., 2010).

Die Bcl-2-Proteine befinden sich in räumlicher Nähe zur oder direkt an und in der äußeren Mitochondrienmembran. Dabei tragen die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine zur Stabilisierung der Mitochondrienmembran bei, während die proapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bax, Bak) Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden können und diese permeabilisieren, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ führt (Kim et al., 2006b). Die Porenbildung von Bax und Bak erfolgt durch Homodi- und Oligomerisierung sowie durch allosterische Konformationsänderung. Die Oligomerisierung von Bax und Bak wird durch die Interaktion (Heterodimerisierung) mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen Bcl-x_L, Bcl-2 und Mcl-1 kontrolliert bzw. blockiert (Green und Kroemer, 2004; Kelly und Strasser, 2011). Die Funktion von Bax kann nicht nur von Konformationsänderungen im Zytosol und Translokation an die Mitochondrienmembran sondern auch durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Beschrieben ist eine deaktivierende Phosphorylierung von Bax an Serin-184 (Gardai et al., 2004; Wang et al., 2010a; Renault und Manon, 2011) und eine aktivierende Phosphorylierung an Threonin-167 (Kim et al., 2006a).

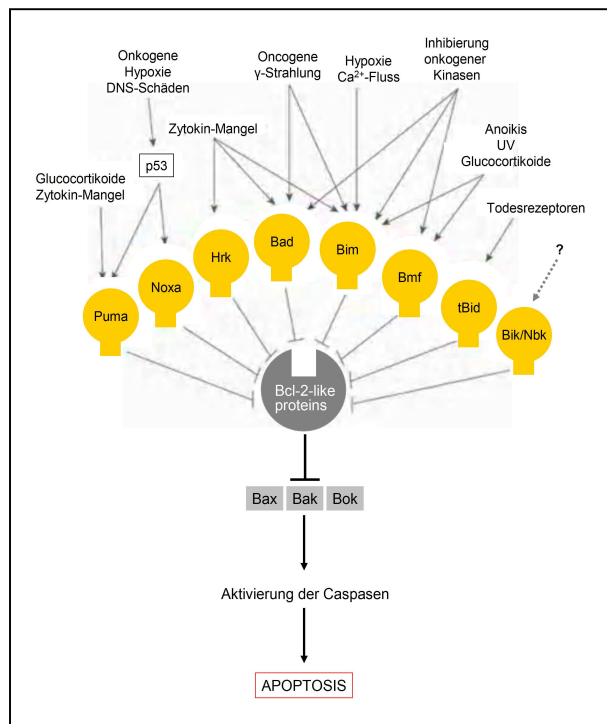


Abbildung 7: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch proapoptotische Bcl-2-Proteine
 Verschiedene apoptotische Stimuli wie die Aktivierung von Onkogenen, DNS Schäden, Hypoxie, Verlust von Wachstumssignalen und Anoikis (Verlust von Zellhaftung) initiieren den intrinsischen Apoptosesignalweg durch Aktivierung verschiedener BH3-only Proteine (nach Kelly und Strasser, 2011).

Apoptoseregulation durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS)

Zu den reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) gehören 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 NOX (NADP-Oxidase, engl.: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) generiert werden und eine Hauptquelle für die Entstehung von ROS unter physiologischen Bedingungen ist die mitochondriale Elektronentransportkette (oxidative Phosphorylierung) (Li et al., 2011; Maryanovich und Gross, 2012). Moderate ROS-Level sind an den Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen beteiligt, wirken als sekundäre Botenstoffe zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, p53 oder AP-1, können Proliferation induzieren und verschiedene Signaltransduktionswege (MAPK, PI3K-Akt/PKB-mTOR, PKC) regulieren. Eine Überproduktion von ROS dagegen löst oxidativen Stress aus, was zu Schäden an der mitochondrialen Membran, an Proteinen, der DNS und schließlich zum Zelltod (sowohl Apoptose als auch Nekrose) führen kann, daher ist ein ausgeglichener ROS-Haushalt für die Zelle überlebenswichtig (Goossens et al., 1999; Li et al., 2011). Proteine können direkt durch oxidative Modifikation von Aminosäure-Seitenketten (hauptsächlich Cysteinreste) geschädigt werden. Die Oxidation von Sulfhydryl (SH)-Gruppen führt zur Ausbildung von Disulfidbrücken und zu einer intramolekularen Quervernetzung, was die Bildung von Protein-Aggregaten zur Folge hätte.

Die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren (Lipidperoxidation) schädigt die Membranintegrität und fördert die Membranpermeabilität. ROS-induzierte Schäden können sich auch auf genetische und epigenetische Prozesse beziehen. Reaktive Sauerstoffradikale können sowohl zu Basen-Modifikationen und zu DNS-Strangbrüchen als auch zu Histon-Modifikationen (durch Oxidation von Cysteinresten in Histondeacetylasen (HDACs) und DNS-Methylierungen führen (Li et al., 2004; McCubrey und Franklin, 2006; Sadidi et al., 2009; Li et al., 2011; Maryanovich und Gross, 2012). Es gibt diverse Berichte, die Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumor-Zellmodellen nach Erzeugung von ROS mit Hilfe verschiedener Substanzen wie Malonat (Neuroblastom, (Gomez-Lazaro et al., 2007)), N-69 (Melanom, (Franke et al., 2010)), γ -Tocotrienol/TRAIL (Kolon-, Pankreaskarzinom und Leukemiezellen, (Kannappan et al., 2010)), TNF (Fibrosarkom, (Goossens et al., 1999)), Arsenit (Zervixkarzinom, Hepatome, (Adler et al., 1999)) oder Chemotherapeutika und γ - Strahlung (Plattenepithelkarzinom, (Li et al., 2004)) und Substanzen der traditionellen chinesischen Medizin (Mammakarzinom, hepatozelluläres Karzinom; (Lee et al., 2012; Kim et al., 2012)) nachweisen konnten.

Die Entstehung von ROS und deren intrazelluläre Konzentration unterliegen der strikten Regulation durch einen zellulären Verteidigungsmechanismus, der antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Catalase) und nicht-enzymatische Moleküle (z.B. Glutathione) umfasst. Zu den physiologisch wirkenden Antioxidantien gehören die Vitamine C und E, sowie die Gruppe der Carotinoide und Flavonoide und einige Mineralstoffe wie Zink, Selen und Mangan (Collins, 1999).

Caspasen

Caspasen gehören zu einer evolutionär konservierten Familie von Aspartat-spezifischen Cystein-abhängigen Proteasen mit zentralen Funktionen in apoptotischen und inflammatorischen Signalwegen (Lamkanfi et al., 2007). Die 14 Mitglieder der Caspasen-Familie werden in vier Gruppen unterteilt; in die Gruppe der Zytokin-prozessierenden Enzyme, in die zwei Gruppen der Apoptose-relevanten Enzyme und in Caspase-14, die an der Keratinozytendifferenzierung beteiligt ist (Abb.8).

Caspase	1,4,5,11,12,13	2,8,9,10	3,6,7	14
Funktion	Inflammation, Reifung pro- inflammatorischer Zytokine	Apoptose	Apoptose	Keratinocyten- differenzierung
		Initiatorcaspasen	Effektorcaspasen	

Abbildung 8: Funktion der Caspasen in humanen Zellen

zusammengefasst und geändert nach (Lamkanfi et al., 2007; Rupinder et al., 2007)

Alle Caspasen weisen Gemeinsamkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Struktur und ihrer Substratspezifität auf. Sie werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) mit drei wichtigen Domänen exprimiert: einer N-terminalen Domäne, einer großen (etwa 20 kDa) und einer kleinen (etwa 10 kDa) Untereinheit. Zur Aktivierung werden die Zymogene an internen proteolytischen Stellen gespalten (Riedl und Shi, 2004; Wang et al., 2005). Die Peptidsequenz $P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'$ ist dann ein Caspase-Substrat, wenn P_1 ein Aspartatrest ist, der P_1' Rest eine kleine, ungeladene Aminosäure (Glycin, Serin, Alanin) und die Reste $P_4-P_3-P_2$ komplementär zur katalytischen Tasche sind, wobei P_3 vorzugsweise ein Glutamin-Rest sein sollte (Shi, 2002; Pop und Salvesen, 2009). Eine Besonderheit stellt die Aktivierung der Caspase-9 dar, denn Procaspase-9 kann auch ohne Prozessierung aktiviert werden, was vermutlich an dem ungewöhnlich langen Verbindungsstück zwischen der großen und der kleinen Untereinheit liegt (Adams und Cory, 2002).

Rolle der Caspasen in der Apoptose

Caspasen spielen in der Apoptoseregulation eine fundamentale Bedeutung. Die Aktivierung der für die Apoptose relevanten Caspasen erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen. Im ersten Schritt wird die Prodomäne abgetrennt und die katalytische Domäne in die große und kleine Untereinheit gespalten. Aktive Caspasen formen jeweils ein Heterotetramer aus zwei identischen großen und zwei identischen kleinen Untereinheiten, wobei sich die beiden Heterodimere in einer Kopf-zu-Schwanz-Konfiguration ausrichten (Rupinder et al., 2007; Pop und Salvesen, 2009). Für die Apoptose entscheidend sind die Initiatorcaspasen (Caspasen-2, -8, -9, -10) und die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7). Initiatorcaspasen besitzen eine große Prodomäne (~ 100 AS) die charakteristische Strukturen zur Oligomerisierung, wie die DED (engl.: **d**eath **e**ffector **d**omain), die CARD (engl.: **c**aspase **r**ecruitment **d**omain) oder die DID (engl.: **d**eath-**i**nducing **d**omain), aufweisen. Diese Domänen vermitteln die homophile Interaktion zwischen Procaspasen und deren Adaptoren und spielen eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung der Procaspasen

(Rupinder et al., 2007). Die autokatalytische Aktivierung der Initiatorcaspasen erfolgt in großen, multimeren Komplexen zu denen das Apoptosom, der DISC und das PIDDosom gehören (Lamkanfi et al., 2007). Die Trimerisierung der Todesrezeptoren induziert die Rekrutierung von Procaspase-8 und FADD zum DISC. FADD assoziiert an den Rezeptor über seine DDs (engl.: **d**eath **d**omains) und bindet gleichzeitig über die DEDs Procaspase-8. Durch die räumliche Nähe kommt es zu einer autokatalytischen Aktivierung der Procaspase-8.

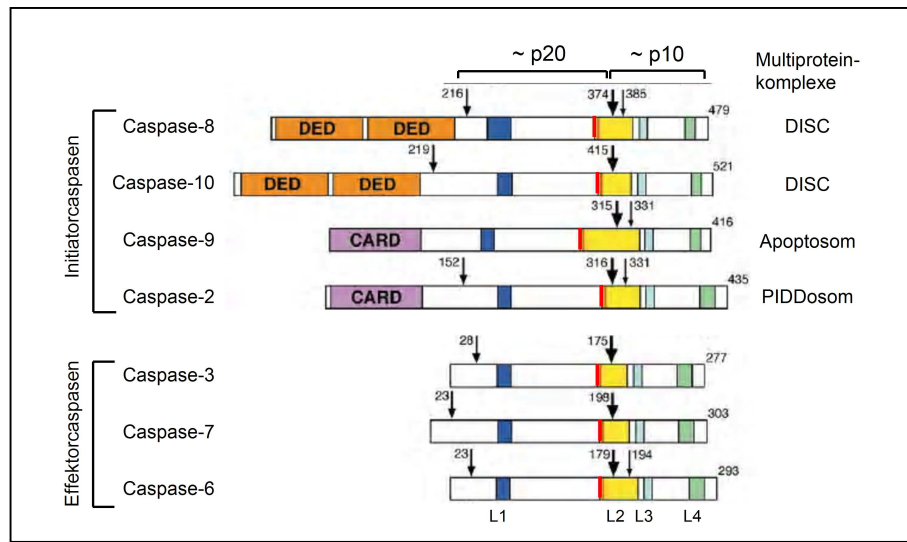


Abbildung 9: Caspaseaufbau.

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 (**d**eath **e**ffector **d**omain) oder CARD (**c**aspase **r**ecruitment **d**omain)-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).

Bindung von Cytochrom C führt zu einer Konformationsänderung von Apaf-1 (offene Konformation) und Bindung von ATP an die CARD ermöglicht Multimerisierung und Bindung von Procaspase-9. Das Apoptosom agiert als Holoenzym (Adams und Cory, 2002). Im PIDDosom ist die Procaspase-2, die nach genotoxischem Stress durch p53 aktiviert werden kann, an die Adapterproteine PIDD (engl.: **p**53-induced protein with **d**eath **d**omain) und RAIDD (engl.: **R**IP-associated **I**CH-1/**C**ED-3-homologous protein with **D**eath **D**omain) gebunden (Tinel und Tschopp, 2004).

Zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen-3, -6 und -7. Die Effektorcaspasen unterscheiden sich in zwei wesentlichen Punkten von den Initiatorcaspasen. Erstens liegen sie als Dimere vor, was an dem ausgeprägt hydrophoben Charakter der Dimer-Schnittstelle liegt. Und Zweitens fehlt ihnen die lange Prodomäne, also auch die Fähigkeit zur Selbstaktivierung. Effektorcaspasen liegen als inaktive Dimere im Zytosol vor und müssen durch Initiatorcaspasen, die einen spezifischen Aspartatrest in der Linkerregion zwischen großer und kleiner Untereinheit spalten, aktiviert werden (Kumar, 1999; Boatright und Salvesen, 2003). Nach ihrer Spaltung kontrollieren die Effektorcaspasen eine Vielzahl von Todessubstraten, die für die Initiation der Apoptose verantwortlich sind (Fischer et al., 2003; Eberle und Hossini, 2008).

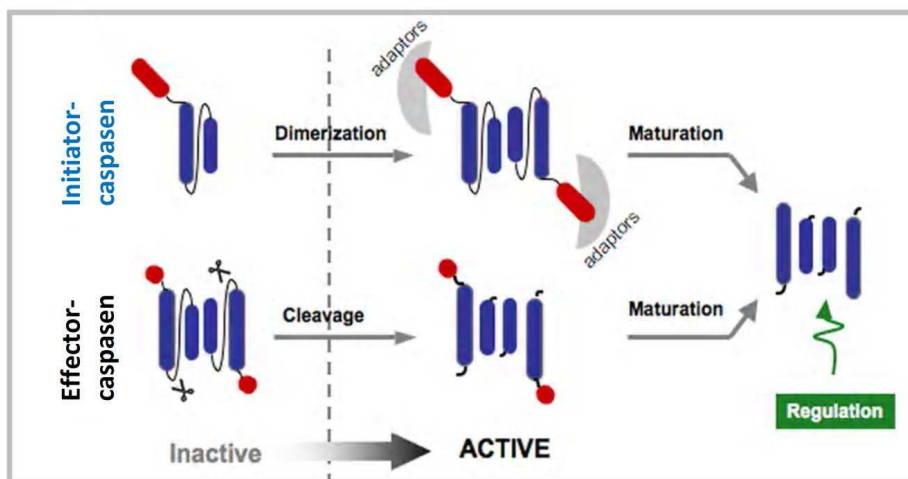


Abbildung 10: Prozessierung von Initiator- und Effektorcaspasen.

Die linke Seite der Abbildung zeigt die Organisation der Caspasen. Vor der katalytischen Domäne, die aus zwei kovalent verknüpften Untereinheiten besteht, steht eine Prodomäne. Die Spaltstellen an den Aspartatresten für die (Auto-) Proteolyse sind gekennzeichnet. Die rechte Seite der Abbildung zeigt den Aktivierungsmechanismus. Initiatorcaspasen sind Monomere, die durch Prodomänen-vermittelte Dimerisierung aktiviert werden. Effektorcaspasen sind Dimere, die durch Spaltung der Linkerregion zwischen den Untereinheiten aktiviert werden. Zusätzliche proteolytische Spaltungen lassen die Caspasen zu stabileren Formen reifen (Pop und Salvesen, 2009).

Kontrollmechanismen der Caspasen

Die Kontrollmechanismen von Caspasen umfassen mehrere Ebenen und beinhalten die Inhibition der Interaktion zwischen den Caspasen und ihren Aktivatoren. Neben den natürlichen Caspase-Inhibitoren können aktive Caspasen auch permanent über den Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Signalweg degradiert und eliminiert werden (Shi, 2002). Zu den natürlichen Inhibitoren der Caspasen zählen die baculoviralen Proteine p35 und p49, sowie das aus dem Kuhpockenvirus stammende Serpin CrmA (engl.: **cytokine response-modifier A**). CrmA bindet und inhibiert aktive Caspasen, vorzugsweise Caspase-1 und -8, während p35 und p49 pan-Caspase-Inhibitoren sind. Diese viralen Proteine inhibieren Caspasen aber eher unspezifisch (Nunez et al., 1998; Shi, 2002; Eckelman et al., 2006). V-FLIP (engl.: **viral FADD-like ICE inhibitory protein**) oder auch das zelluläre Homolog c-FLIP besitzen eine DED, die an FADD bindet, sowie eine Caspasen-ähnliche Domäne, die es FLIP ermöglicht an die Initiatorcaspase-8 zu binden und diese spezifisch zu inhibieren (Nunez et al., 1998).

Einen anderen spezifischen Ansatz der Caspaseninhibition stellt die Familie der konservierten cIAPs (engl.: **cellular inhibitor of apoptosis proteins**) dar. Das charakteristische Merkmal der cIAPs sind die BIR-Domänen (engl.: **baculovirus IAP repeat**). BIR-Domänen sind Zink-bindende, kompakte Strukturen, bestehend aus etwa 70 Aminosäuren, die aus vier α -Helices und drei β -Strängen gebildet werden und konservierte Cystein- und Histidin-Reste aufweisen. BIR-Domänen sind essenziell für die antiapoptotischen Eigenschaften der IAPs (Riedl et al., 2001; Salvesen und Duckett, 2002; Scott et al., 2005). Bis zu drei BIR-Domänen sind in den bisher acht identifizierten IAPs (XIAP, cIAP-1, cIAP-2, NIAP, ILP-2, Livin, Bruce und Survivin) in Säugetierzellen vorhanden. Die individuellen BIR-Domänen haben verschiedene Strategien entwickelt um Caspasen zu inhibieren. Bisher konnte man vier Subtypen (Typ I, II, III und X) innerhalb der Familie der BIR-Domänen identifizieren, wobei Typ II (BIR2) und Typ III (BIR3) eine essenzielle Rolle bei der Inhibition der Caspasen spielen. BIR3-Domänen weisen eine konservierte und negativ geladene Oberflächenfurche auf, die als „IAP-Bindungsmotiv interagierende Furche, engl.: **IBM interacting groove**“ bezeichnet wird, da sie in der Lage ist an das N-terminale IAP-Bindemotiv (IBM, engl.: **IAP-binding motif**) von Proteinen mit IBM zu binden. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die natürlichen IAP-Antagonisten SMAC/DIABLO und Omi/HtrA2. BIR2-Domänen erzielen ihre inhibitorische Wirkung dagegen durch die Bindung an eine Linker-Region unmittelbar N-terminal zu der BIR2-Domäne der Caspasen. Diese Bindung führt zu einer sterischen Okklusion der Substratfurche und verhindert so die Interaktion der Caspasensubstrate mit

der katalytischen Maschinerie der Caspasen (Scott et al., 2005; Eckelman et al., 2008). Neben den BIR-Domänen weisen einige IAPs noch andere funktionelle Domänen auf. Einige IAPs verfügen nahe dem C-Terminus über eine RING-Domäne (engl.: **r**eally **i**nteresting **n**ew **g**ene), die eine E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität besitzt. Andere IAPs, wie cIAP-1 und -2, haben zusätzlich eine CARD, die zwischen den BIR-Domänen und der RING-Domäne lokalisiert ist. Zusätzlich verfügen einige IAPs noch über eine Ubiquitin-konjugierende Domäne (UBC, engl.: **u**biquitin-conjugation domain), eine Nukleotid-Oligomerisierungs-Domäne (NACHT) oder aber Leucinreiche Wiederholungen (LRR, engl.: **l**eucin-**r**ich **r**epeats) (Deveraux et al., 1999a; Deveraux et al., 1999b; Eckelman et al., 2006; Fulda, 2009a).

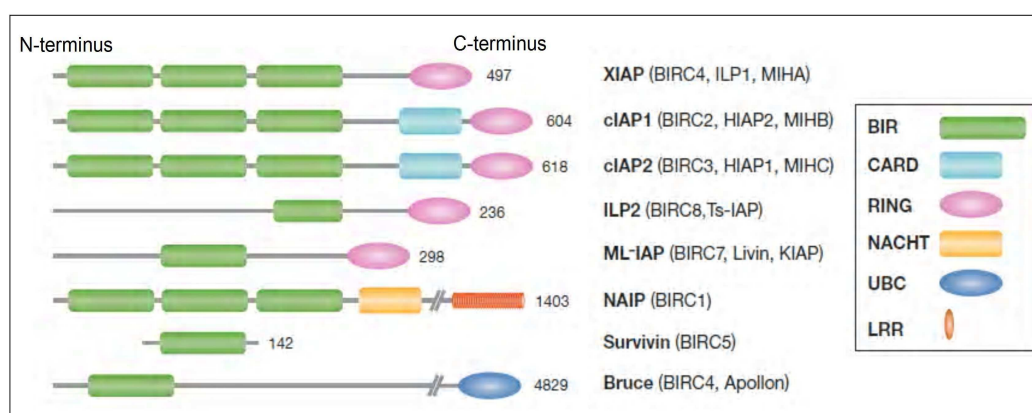


Abbildung 11: Schematische Darstellung verschiedener Mitglieder der IAP-Proteinfamilie.

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. Die Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARDs) können homotypische 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).

XIAP (**X**-chromosome-linked **i**nhibitor of **a**poptosis **p**rotein) ist das am Besten charakterisierte IAP. Die BIR3-Domäne von XIAP ist in der Lage, durch Bindung des N-Terminus der kleinen Untereinheit der Caspase an die „IBM interacting groove“, die Dimerisierung der Initiatorcaspase-9 zu blockieren und die Caspase so in einem inaktiven, monomeren Zustand zu halten. Die BIR2-Linker-Domäne von XIAP ist dagegen in der Lage das katalytische Zentrum der Effektorcaspasen-3 und -7 zu binden und sie so durch sterische Okklusion zu inhibieren (Scott et al., 2005; Bratton und Salvesen, 2010).

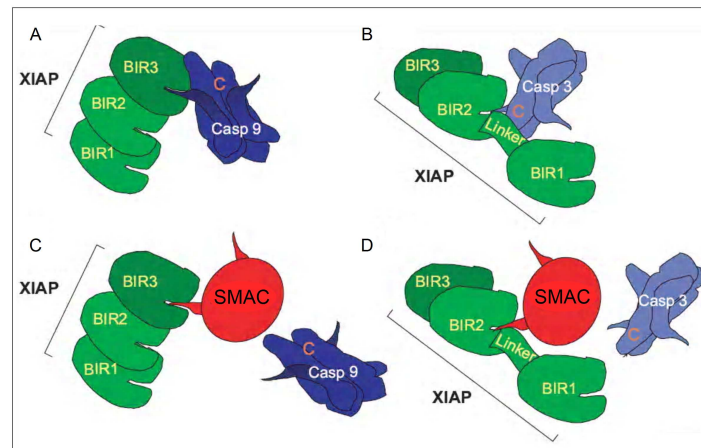


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Mechanismus zur Caspaseinhibition.

(A) Der N-Terminus der p10 Untereinheit von Caspase-9, der durch Autoprozessierung freigelegt wird, interagiert mit der Furche der BIR3-Domäne von XIAP. (B) Die Linkerregion oberhalb der BIR2-Domäne von XIAP interagiert mit der katalytischen Stelle der Caspase-3 und -7, was zu einer effektiven Caspaseinhibition führt (C zeigt den katalytischen Cysteinrest). (C) Der N-Terminus von SMAC ist ähnlich dem von Caspase-9 und konkurriert um dieselbe Interaktionsstelle in der BIR3-Domäne. (D) Eine ähnliche Furche innerhalb der BIR2-Domäne von XIAP vermittelt die Interaktion mit SMAC und stellt so einen Mechanismus zur Verfügung um Caspase-3 von XIAP zu lösen. (Verhagen et al, 2001).

Im Allgemeinen werden IAPs mit der Regulation der Caspase-abhängigen Apoptose in Verbindung gebracht, spielen aber in verschiedenen anderen Signalwegen ebenfalls eine bedeutsame Rolle. Neben der Ubiquitin-abhängigen Regulation der Aktivierung von NF- κ B (Galban und Duckett, 2010) sollen die IAPs in der Metastasierung, der MAPK- (engl.: **Mitogen-activated protein kinase**) Signalgebung, der Aktivierung der TGF- β Superfamilie, der Aktivierung des JNK-Signalweges, der Zellteilung sowie der Mitose eine Rolle spielen (Salvesen und Duckett, 2002; Dogan et al., 2008; Mehrotra et al., 2010). Zudem ist die Expression von verschiedenen Mitgliedern der IAP-Proteinfamilie in diversen Tumoren mit Chemoresistenz, Progression und schlechter Prognose verbunden (LaCasse et al., 2008).

Regulation der IAPs durch natürliche Antagonisten

Bis dato wurden vier IAP-interagierende Proteine, SMAC/DIABLO (engl.: **second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI**), Omi/HtrA2, XAF1 (engl.: **XIAP-associated factor**) und NRAGE (engl.: **neurotrophin-receptor-interacting melanoma antigen gene homologue**) in Säugetierzellen identifiziert. Allerdings ist nur für SMAC der genaue Mechanismus der IAP-Blockierung bekannt. SMAC wird als Vorläuferprodukt im Kern produziert und mittels seiner N-terminalen, mitochondrialen Importsequenz an die Mitochondrien geführt. SMAC bildet ein Homodimer aus zwei Monomeren, die aus einem Bündel mit drei α -Helices bestehen. SMAC ist in den meisten

Gewebe exprimiert und ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Das Protein wird nicht transkriptionell sondern nur über seine Lokalisation innerhalb der Zelle reguliert. SMAC begünstigt die Apoptose, in dem es die Bindung der IAPs an und somit die Inhibition der Caspasen verhindert. Diese Interaktion wird über ein N-terminales Tetrapeptid (Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin) vermittelt, das in die Oberflächenfurche von BIR2 und BIR3 von XIAP bindet. Der Alaninrest spielt bei dieser Bindung eine essenzielle Rolle, da er Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureresten innerhalb der BIRs vermittelt. Da die kleine Untereinheit der Caspase-9 auch über ein N-terminales Tetrapeptid (Alanin-Threonin-Prolin-Phenylalanin) verfügt, welches nach der Autoproteolyse der Caspase-9 frei wird, konkurrieren Caspase-9 und SMAC direkt um die Bindung mit XIAP (siehe Abb. 12) (Chai et al., 2000; Verhagen und Vaux, 2002; Vaux und Silke, 2003). Omi/HtrA2 ist eine Serinprotease mit einem IBM-Sequenzmotiv und ähnlich wie SMAC besitzt Omi/HtrA2 eine N-terminale, mitochondriale Zielsequenz (engl.: mitochondrial-targeting sequence). Struktur-Funktions-Studien haben gezeigt, dass die Serinprotease-Aktivität an dem proapoptotischen Effekt von Omi/HtrA2 beteiligt ist. XAF1 und NRAGE sind Proteine die ohne IBM-Sequenzmotive an IAPs binden und die apoptotische Schwelle absenken. XAF1 wirkt dabei als negativer Regulator von XIAP, NRAGE benötigt die RING-Domäne der IAPs zur Bindung und ist wahrscheinlich an einem Inaktivierungs-/Sequestrierungsmechanismus beteiligt (Salvesen und Duckett, 2002). Die Erkenntnis der Inhibition der IAPs durch natürliche Antagonisten führte zu der Entwicklung von so genannten SMAC-Mimetika, synthetischen Peptiden die dem physiologischen IAP-Inhibitor SMAC/DIABLO ähneln. In verschiedenen klinischen Studien wird der therapeutische Nutzen dieser Peptide derzeit untersucht (Jost et al., 2009; Gyrd-Hansen und Meier, 2010).

TRAIL

TRAIL und seine Rezeptoren

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gehört zur Familie der TNF-(engl.: tumor necrosis factor) Zytokin-Superfamilie und wurde 1995 durch zwei unabhängige Gruppen auf Grundlage der Sequenzhomologie zu TNF- α und CD95 (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996) entdeckt. Ähnlich wie andere Familienmitglieder ist TRAIL ein Typ-II Transmembranprotein, wobei der C-Terminus extrazellulär und der N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist. Auffällig ist, dass nur der C-Terminus von TRAIL Sequenzhomologien mit anderen TNF-Familienmitgliedern aufweist, so etwa 28% identische Sequenzen mit FasL und 23% mit TNF- α . Zudem kann die extrazelluläre

Domäne proteolytisch abgespalten werden und als löslicher Ligand vorliegen (Abe et al., 2000; Almasan und Ashkenazi, 2003). TRAIL formt ein Homotrimer, das an drei Rezeptormoleküle, jeweils an der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten, bindet. Ein Zinkatom, das von Cysteinresten im trimeren Ligand gebunden wird, ist essenziell für die Stabilität des Trimers und dessen optimale biologische Aktivität (Almasan und Ashkenazi, 2003; Wang und El Deiry, 2003). Im Gegensatz zu anderen TNF-Familienmitgliedern, die häufig nur transient in aktivierten Zellen exprimiert werden und deren Expression strikt kontrolliert wird, ist die TRAIL mRNA in einer Vielzahl von Geweben konstitutiv exprimiert, was darauf hindeutet, dass TRAIL in den meisten Geweben *in vivo* nicht zytotoxisch ist (Wang und El Deiry, 2003; Di Pietro und Zauli, 2004). TRAIL-defiziente (TRAIL^{-/-}) Mäuse sind lebensfähig, entwickeln sich normal, haben keine hämatologischen Defekte und sind fertil, aber ihre Sensitivität für immuninflammatorische Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis ist stark erhöht. Es wurde gezeigt, dass TRAIL in der Entwicklung keine, in der Regulation des Immunsystems aber eine entscheidende Rolle spielt. TRAIL wird vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert, etwa auf CD4⁺-T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten. Die physiologische Rolle von TRAIL beschränkt sich auf Immunüberwachung (sowohl angeborene als auch adaptive Immunität) und Immunsystem-vermittelte Tumorsuppression (Almasan und Ashkenazi, 2003; Di Pietro und Zauli, 2004; Dimberg et al., 2012b; Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Zytokine der TNF-Superfamilie spielen eine wichtige Rolle in der Apoptose, beim Zellwachstum, in der Differenzierung, in verschiedenen Signalwegen und im Immunsystem (Srivastava, 2001; Di Pietro und Zauli, 2004).

Neben der Bindung an seine agonistischen Todesrezeptoren DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2) kann TRAIL auch an zwei antagonistische Köder-Rezeptoren DcR1 (engl.: Decoy; TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4) sowie an den löslichen Rezeptor OPG (Osteoprotegerin) binden (Johnstone et al., 2008; Mahalingam et al., 2009). Der DcR1 ist ein Oberflächenprotein mit GPI-Anker, das über keine zytosolischen Domänen verfügt, während der DcR2 nur eine verkürzte, nicht funktionelle zytoplasmatische Todesdomäne aufweist, wodurch beide TRAIL-Decoy-Rezeptoren nicht in der Lage sind das Todessignal weiterzuleiten und die Formierung des DISC einzuleiten. Allerdings konkurrieren sie direkt mit DR4 und DR5 um die TRAIL-Bindungsstelle (Almasan und Ashkenazi, 2003). Die agonistischen Rezeptoren DR4 und DR5 weisen wesentliche Ähnlichkeiten in der Genstruktur und dem Genexpressionsmuster auf und scheinen ubiquitär exprimiert zu sein. Beide Rezeptoren sind Typ-I Transmembranproteine mit einer extrazellulären, Cysteinreichen Domäne und einer intrazellulären Todesdomäne, die Homologien zu den anderen Apoptose-induzierenden Mitgliedern der TNF-Rezeptorsuperfamilie (TNFR1, Fas)

aufweisen. Erstaunlicherweise ist DR5 in der Lage mit DR4 zu assoziieren und einen Heterorezeptor-Komplex zu bilden, von dem angenommen wird, dass er physiologische Aktivitäten vermittelt, die in einem klaren Kontrast zu den Aktivitäten des Homorezeptor-Komplexes und damit der Apoptoseinduktion stehen (Degli-Esposti, 1999).

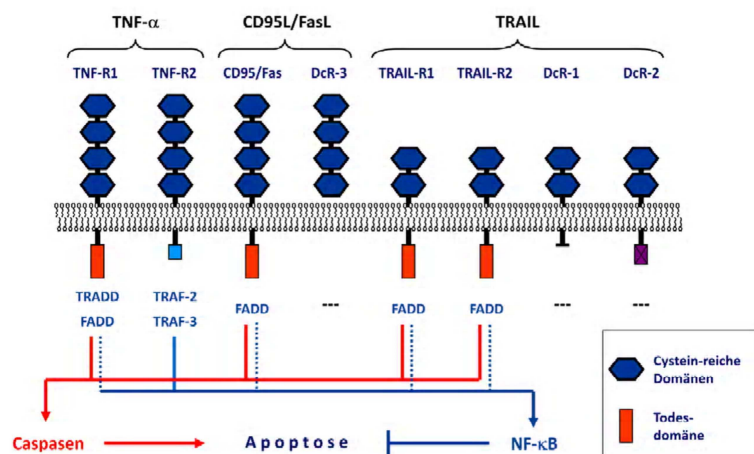


Abbildung 13: Todesliganden und ihre Rezeptoren.

Schematische Darstellung der bedeutsamsten Todesliganden und der entsprechenden Todesrezeptoren sowie nachgeschalteter Signalwege (Eberle et al., 2007).

Aktivierung alternativer Signalwege durch TRAIL

Abhängig vom Zelltyp, der relativen Stärke und der Dauer des vom Liganden vermittelten Signals, kann die Behandlung mit TRAIL die Zellproliferation stimulieren und zeitgleich verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege induzieren. Dazu gehören der NF- κ B (engl.: **n**uclear **f**actor **k**appa **B**)-Signalweg, der MAPK (engl.: **m**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase)-Signalweg, der JNK (engl.: **c**-**J**un **N**-terminal **k**inase)-Signalweg und der PI3K (engl.: **P**hosphatidylinositol-**3**-**k**inase)-Akt/PKB (**P**roteinkinase **B**)-Signalweg. Die Bindung von TRAIL an DR4, DR5 oder DcR2 führt zur Aktivierung von NF- κ B und der MAPKs durch TRADD (engl.: **T**NFR1-associated **d**eath **d**omain protein), TRAF2 (engl.: **T**NF receptor-associated **f**actor **2**) und RIP (engl.: **r**eceptor-interacting **p**rotein), die unabhängig von Caspase-8 und -10 einen Signalkomplex bilden können. Vermehrte NF- κ B-Aktivierung indess wurde unter anderem mit der TRAIL-Resistenz von leukämischen und Neuroblastom-Zelllinien in Verbindung gebracht. Die Aktivierung des JNK-Signalweges wird über die TRAF2-MEKK1-MKK4-Signalkette vermittelt und ist unabhängig von der NIK-IKK α/β Kaskade. Aktivierung der MAP-kinase ERK1/2 (engl.: **e**xtracellular signal-regulated **k**inase **1/2**) durch TRAIL kann zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation in verschiedenen Tumorzellen, zur Expression der antiapoptotischen

Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L und zur Apoptoseresistenz führen. Die Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges wird als wichtiges onkogenes Ereignis gesehen, dass zur Stimulation von Wachstum und Überleben von Tumorzellen führt. TRAIL ist in der Lage die Phosphorylierung und Aktivierung von PI3K und Akt/PKB in verschiedenen Zellen zu induzieren. Akt/PKB ist dann in der Lage die Aktivierung der apikalen Caspasen, entweder durch direkte Phosphorylierung der Caspase-9 oder durch die Blockierung der Rekrutierung der Procaspase-8 und -10 an den DISC, zu beeinträchtigen. Die Bedeutung des PI3K-Akt/PKB-Signalweges für die Sensitivierung von Tumorzellen für eine TRAIL-induzierte Apoptose wurde in genetischen Studien gezeigt, denn Tumorzellen mit einer aktivierenden, somatischen Mutation in der PI3-Kinase sind resistent gegen eine TRAIL-vermittelte Apoptose. Neben der Regulation der Überlebens-Signalwege (engl.: survival pathways) reguliert der TRAIL-TRAIL-Rezeptor-Signalweg sowohl physiologische Prozesse wie die Hämatopoese und die T-Zell-Aktivierung als auch pathophysiologische Zustände wie Asthma, Autoimmunerkrankungen, Diabetes und Inflammation (Di Pietro und Zauli, 2004; Falschlehner et al., 2007; Johnstone et al., 2008; Dimberg et al., 2012b). Die Aktivierung eines oder mehrerer Signaltransduktionswege in einer Art und Weise, die über das proapoptotische Signal dominiert, kann dramatische Auswirkungen auf die physiologischen und therapeutischen Eigenschaften von TRAIL oder von agonistischen anti-TRAIL-Rezeptor-Antikörpern haben.

Resistenzentwicklung

Die Resistenz gegenüber TRAIL stellt eines der größten Hindernisse in der Entwicklung einer effizienten Therapie dar (Wang und El Deiry, 2003). Analysen der molekularen Mechanismen der TRAIL-Resistenz haben zur Identifizierung einiger charakteristischer Defekte im Apoptosesignalweg von Krebszellen geführt. Resistenzmechanismen können sich sowohl an der Membran als auch intrazellulär entwickeln (Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Resistenzmechanismen auf der Ebene der Todesrezeptoren können durch eine höhere Präsenz von Decoy-Rezeptoren, die mit den funktionellen Todesrezeptoren konkurrieren, entstehen. Es kann zu einem Verlust der Expression von DR4 und/oder DR5 an der Zelloberfläche sowie zu Mutationen in den Todesrezeptoren, die unter anderem Rezeptortrimerisierung verhindern können, kommen. DR4-Mutationen kommen in bis zu 44% der Zellen von Ovarial-, Brust-, Blasen- und Lungentumoren vor. Bis zu 10% der Zellen in Kopf-, Hals-, nicht-kleinzelligen Lungen- und Brusttumoren, Non-Hodgkin Lymphomen und hepatozellulären Karzinomen weisen Mutationen in dem für die DR5-Todesdomäne codierenden Genbereich auf. Zur TRAIL-Resistenz können auch die Verteilung der

Todesrezeptoren in der Membran, was die Aktivität der Rezeptoren beeinflusst, und der ineffiziente Transport der Rezeptoren an die Zellmembran, z.B. durch Glykosylierung, beitragen (Zhang und Fang, 2005; Maksimovic-Ivanic et al., 2012; Dimberg et al., 2012b). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die funktionelle Expression von DR4 und DR5 mit der TRAIL-Resistenz in Lungen-, Kolon- und Brustkrebszellen in Verbindung steht (Kim et al., 2000; Jin et al., 2004).

Resistenzmechanismen auf der intrazellulären Ebene können mit einer verminderten Expression der Initiatorcaspasen-8 und -10 in Melanom-, Kolon- und Neuroblastomzelllinien in Verbindung gebracht werden (Grotzer et al., 2000; Jin et al., 2004; Kurbanov et al., 2007), zudem kann es zu verminderter Transkription der Caspase-8 durch Promotor-DNS Methylierung, zur Deletion des Caspase-8-Genes oder zu einer vermehrten Caspase-8 Degradierung kommen (Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Aber auch die Überexpression von c-FLIP und von verschiedenen IAPs wie XIAP, Survivin oder c-IAP1/2 kann zu einer TRAIL-Resistenz beitragen (Tanaka et al., 2000; Mahalingam et al., 2009; Dimberg et al., 2012a; Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) kann ebenfalls zu einer intrazellulär-vermittelten Resistenz führen, da aktivierte PKC die Rekrutierung von Adaptorproteinen mit Todesdomänen (DD) an den Membran-assoziierten Signalkomplex (DISC) verhindern kann (Wang und El Deiry, 2003). In Tumorzellen vom Typ-II ist die Liste der Moleküle die zu TRAIL-Resistenzen führen auch auf alle zytoprotektiven Moleküle, die an der Regulation des mitochondrialen Signalweges beteiligt sind, ausgedehnt. Dazu gehört die hohe Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 in Neuroblastom-, Glioblastom- und Brustkrebszelllinien, von Bcl-x_L in Pankreaskrebszellen oder von Mcl-1 in Kolon- und hepatozellulären Karzinomen und Cholangiokarzinomen (Mahalingam et al., 2009; Gillissen et al., 2010). Melanomzelllinien sind, wie andere Zellen auch, grundsätzlich sensitiv für die TRAIL-induzierte Apoptose, trotzdem können Melanomzelllinien eine vorhandene oder aber eine induzierbare Resistenz, die durch eine kontinuierliche Behandlung mit TRAIL erzeugt wird, aufweisen (Zhang et al., 2006; Kurbanov et al., 2007). Die induzierbare TRAIL-Resistenz in DR4-positiven Melanomzellen hat sich als transient erwiesen. Selektierte, TRAIL-resistente Melanomzellen sind durch die Herabregulation von DR4 und/oder DR5 und durch die Herabregulation der Initiatorcaspasen und des proapoptotischen Proteins Bid charakterisiert (Kurbanov et al., 2007).

Anwendung von TRAIL in der Tumorthherapie

Todesliganden haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein gewisses Potential für die Krebstherapie gezeigt. Im Gegensatz zu vielen anderen Krebstherapeutika induzieren sie

Apoptose in Tumorzellen unabhängig von Bcl-2, Bcl-x_L und p53, welches in mehr als der Hälfte der humanen Krebsarten inaktiviert ist (Walczak et al., 2000; Wang und El Deiry, 2003). Folglich könnten Todesliganden effektiv gegen Tumore wirken, die eine Resistenz gegen konventionelle Therapien wie Chemo- und Radiotherapie aufweisen (Dimberg et al., 2012b). Trotz dieses möglichen Vorteils zeigte sich für TNF- α und CD95L in der klinischen Anwendung eine hohe Toxizität gegen normale Gewebezellen, die zum Tod der Versuchstiere im experimentellen Modell führte (Ashkenazi, 2002). Die intravenöse Verabreichung von TNF- α kann zu einem systemischen Inflammationssyndrom führen, welches einem septischen Schock ähnelt, der durch die Aktivierung von proinflammatorischem NF- κ B in vaskulären Endothelialzellen und Makrophagen entstehen kann. Die Injektion des agonistischen anti-CD95-Antikörpers CH-11 bewirkt ein Leberversagen im Mausmodell durch eine Induktion der Apoptose in Hepatozyten (Kelley und Ashkenazi, 2004). Die einzigartige Fähigkeit von TRAIL Apoptose in einer Vielzahl von Krebszellen zu induzieren, während es nur eine geringe Toxizität gegenüber normalen Zellen aufweist, unterscheidet TRAIL von den anderen Liganden der TNF-Superfamilie und lässt vermuten, dass TRAIL nützlich in der Krebstherapie sein könnte (Maksimovic-Ivanic et al., 2012).

Krebszelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Kolon, Lunge, Brust, Prostata, Pankreas, Niere, Schilddrüse, Haut) sowie Zelllinien aus Lymphomen, 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) zeigten eine beachtenswerte Antitumoraktivität nach Behandlung mit TRAIL als Monotherapie oder in Kombination mit konventioneller Chemo- oder Radiotherapie (Di Pietro und Zauli, 2004; Cretney et al., 2007). Klinische Studien mit soliden Tumoren und Lymphomen mit TRAIL und TRAIL-Rezeptor-Agonisten als Monotherapie zeigten geringe Toxizität in Patienten aber leider auch nur eine beschränkte Effektivität (Herbst et al., 2010a; Herbst et al., 2010b; Younes et al., 2010). Die Kombination von TRAIL mit anderen Therapeutika wie Chemotherapeutika, Proteasominhibitoren, biologischen Wirkstoffen und anderen Substanzen erscheint daher zwingend notwendig. Die TRAIL-induzierte Apoptose konnte durch die Kombination mit IFN- α (Qu et al., 2011), 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., 2010; Berger et al., 2013) synergistisch verstärkt werden. Der diesem Synergismus zu Grunde liegende Mechanismus variiert zwischen den Therapieansätzen, umfasst aber die Hochregulierung der TRAIL-

Todesrezeptoren, Modulation der Mitglieder der Bcl-2-Familie und die Inhibition der Mitglieder der IAP-Familie.

Da viele Tumore durch eine hohe Expression von Decoy-Rezeptoren vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt sind, könnte sich die Behandlung von Tumorzellen mit spezifischen, agonistischen Todesrezeptor-Antikörpern als effizienter erweisen. In *in vitro*-Studien konnte der Antitumoreffekt von Lexatumumab (monoklonaler anti-DR5-Antikörper) und von Mapatumumab (monoklonaler anti-DR4-Antikörper) durch die Kombination mit Cisplatin synergistisch verstärkt werden (Belyanskaya et al., 2007; Wu und Kakehi, 2009). Wie aber schon für TRAIL, zeigten sich in den klinischen Studien mit anti-DR-Antikörper-Monotherapien oder auch für die Kombinationen nur geringe Effekte. Studien-Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) zeigten nur ein geringes Ansprechen auf die Kombination von Dulanermin (rekombinantes humanes Apo2L/TRAIL) mit Paclitaxel, Carboplatin und Bevacizumab (einem Antikörper gegen VEGF) (Soria et al., 2011). Gegenwärtig gibt es zahlreiche aktuelle Studien die das therapeutische Potential von agonistischen Todesrezeptor-spezifischen Antikörpern als Monotherapie oder aber in Kombination mit Chemotherapeutika, Kinaseinhibitoren, Antikörpern gegen Komponenten der Wachstumsfaktor-Signalwege, wie Bevacizumab oder Cetuximab (anti-EGF-Rezeptor Antikörper), HDAC-Inhibitoren, Proteasominhibitoren oder immun-modulatorischen Substanzen in unterschiedlichen Krebsentitäten (solide Tumore, hämatologische Tumore, NSCLC, Non-Hodgkin-Lymphomen und Sarkomen) untersuchen ((Johnstone et al., 2008) und Datenbank der Klinischen Studien: www.ClinicalTrials.gov)).

Proteinkinasen

In eukaryotischen Zellen spielen Proteinkinasen eine Schlüsselrolle in der Regulation verschiedener biologischer Prozesse. Proteinkinasen sind Enzyme die den Transfer von Orthophosphatresten (PO_3^-) von ATP auf andere Substrate katalysieren. Durch Proteinkinasen können die Aktivitäten von Enzymen, Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Proteinkinasen regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Zelladhäsion, Angiogenese und Apoptose. Eine Dysfunktion von Proteinkinasen kann zu schweren pathophysiologischen Effekten im menschlichen Organismus führen (Sachsenmaier, 2001). Bei einer Vielzahl von neurologischen, kardiovaskulären, inflammatorischen und proliferativen Erkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Asthma und Krebs konnte eine Fehlregulation einzelner Proteinkinasen nachgewiesen werden. Eine Überfunktion von Kinasen ist speziell im Zusammenhang mit Krebs von großer

Bedeutung. Die Hyperaktivität kann auf Faktoren wie Überexpression der Kinase, Verlust an inhibierenden Faktoren, Überexpression an stimulierenden Faktoren oder die konstitutive Aktivität der Kinase zurückgeführt werden. In der Tumorgenese spielen Proteinkinasen eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsprozessen, die die Bereiche Angiogenese, Proliferation, Metastasierung, Überleben, Apoptose und Transkription betreffen (Melnikova und Golden, 2004; Duong-Ly und Peterson, 2013). Aufgrund der weitreichenden Einflüsse der Proteinkinasen müssen diese Enzyme streng reguliert werden.

Zu den regulierenden Faktoren gehören Kofaktoren und Botenstoffe (Ca^{2+} , Mg^{2+} , IP_3 , cAMP), Aktivator- und Inhibitorproteine, Autoinhibition, Ligandenbindung an die regulatorische Untereinheit, Phosphorylierung im aktiven Zentrum – entweder durch eine andere Proteinkinase (Transphosphorylierung) oder durch sich selbst (Cis- oder Autophosphorylierung) oder aber die subzelluläre Lokalisierung innerhalb der Zelle (Manning, 2005). Die Proteinkinasen werden in Anlehnung an ihre Wirksamkeit in die Gruppe der Transferasen eingeordnet. In Eukaryoten erfolgt die Phosphorylierung an den Hydroxylgruppen von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten der Substrate (Vulpetti und Bosotti, 2004). In Abhängigkeit ihrer Substratspezifität ist eine Unterteilung der Proteinkinasen in Serin-/Threonin- und Tyrosinkinase möglich (Sachsenmaier, 2001; Garcia-Echeverria, 2009).

Im Folgenden werden diese näher erläutert:

1. Tyrosinkinase:

Die Tyrosinkinase werden in Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase unterteilt. RTK sind Transmembranproteine mit einer Liganden-bindenden Domäne auf der extrazellulären Seite, einem einzelnen Transmembran-Segment und einem zyttoplasmatischen Abschnitt, der die Protein Tyrosin-Kinase Aktivität enthält. Aktiviert werden RTK durch Liganden-induzierte Dimerisierung, was zur Phosphorylierung von Tyrosinresten im zyttoplasmatischen Teil des Rezeptors führt. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Erkennungsmotiv für Proteine mit SH2-(engl.: **S**rc **h**omology 2) und PTB-(engl.: **p**rotein **t**yrosine **b**inding) Domänen. Zu dieser Familie zählen unter anderem die Insulin-Rezeptoren und die epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR; engl.: **e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor). Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase sind zyttoplasmatische oder nukleäre Enzyme, die häufig mit Rezeptoren, die keine eigene intrinsische Kinaseaktivität aufweisen, assoziiert sind, wie den Zytokin-Rezeptoren oder dem T- und B- Zell-Rezeptor. Zu den bekanntesten Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase gehören ABL (engl.: **A**belson **l**eukemia **v**irus) und SRC (engl.: Rous **S**arcoma virus transforming oncogene) (Sachsenmaier, 2001; Garcia-Echeverria, 2009).

2. Serin-/Threoninkinasen:

In vielen Tumorerkrankungen ist die Gruppe der Serin-/Threoninkinasen konstitutiv aktiv und führt so zu unkontrollierter Zellproliferation und zur Entwicklung von Resistenzmechanismen. Zur Familie der Serin-/Threoninkinasen gehören unter anderem die Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK, engl.: **cyclin-dependent kinases**), die zusammen mit den Zyklinen die zentralen Regulatoren des Zellzyklus darstellen (Huwe et al., 2003); die MAP-Kinasen (RAF-MEK-ERK), die Genexpression, Proliferation und das Überleben der Zelle regulieren; die Aurorakinasen, die für eine einwandfreie Trennung der Chromosomen während der Mitose sorgen und die Gruppe der AGC-Kinasen (PKA, PKC, PKB, PDK1 und andere), die eine große Rolle bei der Signaltransduktion und der Zellproliferation spielen (Sachsenmaier, 2001; Gold et al., 2006). Eine weitere wichtige und große Gruppe der Proteinkinasen stellt die Familie der PI3K-verwandeten Kinasen (PIKKs, engl.: **PI3K-related kinases**) dar, zu denen PI3K (Phosphatidylinositol-**3**-kinase), mTOR (engl.: **mammalian target of rapamycin**), ATM (engl.: **Ataxia telangiectasia mutated**), ATR (engl.: **Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein**) und DNA-PK (DNA-Proteinkinase) gehören. PI3-Kinasen regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellwachstum und Überleben der Zelle, Metabolismus, Kontrolle der Zellgröße, Zellzyklus, Zell-Zell-Kommunikation und Immunantwort (Stiles, 2009). Alle PIKKs verfügen über eine charakteristische PI3K-homologe Kinasedomäne und einen stark konservierten C-Terminus. Alle Mitglieder der PIKK-Familie spielen eine Rolle in Krebserkrankungen, sowohl als Onkogene (Typ I PI3K) oder als Tumorsuppressoren (ATM und ATR). Allerdings ist nur von PI3K bekannt, dass dieses Enzym sowohl eine Protein- als auch Lipidkinase ist. Im weiteren Verlauf beschäftigen wir uns hauptsächlich mit der PI3K und dem von ihr induzierten Signalweg (Abb.14). Die PI3K phosphoryliert die Hydroxylgruppe an Position drei des Inositolringes (D3) von Phosphatidylinositol und generiert so $PI(3,4)P_2$ (Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat) und $PI(3,4,5)P_3$ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat). Die so generierten Phospholipide fungieren als sekundäre Botenstoffe und aktivieren den Akt/PKB-Signalweg durch Rekrutierung von Akt/PKB an die Plasmamembran. Die Rekrutierung von Akt/PKB erfolgt durch Interaktion von $PI(3,4,5)P_3$ mit der PH-(engl.: **Plekstrin homology**) Domäne der Serin-/Threoninkinase Akt/PKB (Vivanco und Sawyers, 2002; Chen et al., 2012).

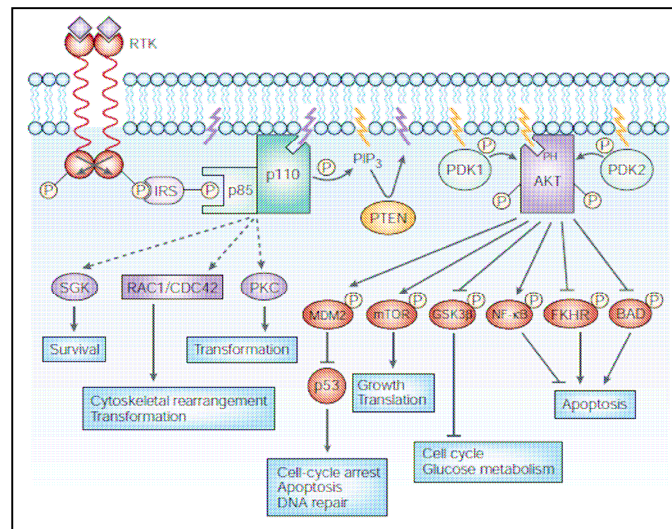


Abbildung 14: Der PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweg.

Aktivierung der Klasse IA-PI3K erfolgt über die Stimulation der RTKs und der gleichzeitigen Zusammenlagerung des Rezeptor-PI3K-Komplexes. Dieser Komplex ist an der Membran lokalisiert, wo die katalytische Untereinheit der PI3K (p110) PIP₂ in PIP₃ konvertiert. PIP₃ fungiert als sekundärer Botenstoff, der eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von PDK1 und Akt/PKB spielt. Durch Phosphorylierungen wird Akt/PKB vollständig aktiviert und ist anschließend in der Lage diverse Zielproteine zu phosphorylieren und so wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, Zellproliferation und das Überleben der Zelle zu steuern (Vivanco und Sawyers, 2002).

Die Familie der PI3-Kinasen ist aufgrund ihrer Primärstruktur, Regulation und Lipid-Substrat-Spezifität in drei Klassen mit zwei Unterklassen unterteilt, Klasse I, II und III. Die PI3Ks sind Heterodimere mit separaten regulatorischen und katalytischen Untereinheiten. Die verschiedenen Klassen der PI3-Kinasen werden im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

Typ	Subtyp	Struktur	Regulation
I	Ia	Heterodimere aus einer katalytischen Untereinheit (p110α, β, γ) und einer regulatorischen Untereinheit (p85α; p55α,γ oder p50α)	Aktivierung durch Wachstumsfaktor-RTK
	Ib	Heterodimere aus einer katalytischen Untereinheit (p101) und einer regulatorischen Untereinheit (p84; p87)	Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren
II		Drei katalytische Isoformen C2α, C2β und C2γ ohne regulatorische Untereinheiten	Katalyse der Produktion von PIP und PI(3,4)P ₂
III		Heterodimere aus einer katalytischen Untereinheit (Vps34) und einer regulatorischen Untereinheit (p150)	Protein- und Vesikeltransport; Regulation von mTOR durch Vps34

Abbildung 15: Die Familie der PI3-Kinasen.

Unterteilung der PI3Ks aufgrund ihrer Primärstruktur, ihrer Regulation und ihrer Lipid-Substratspezifität in drei Typen (Typ I-III) (Foster et al., 2012).

Die Serin-/Threoninkinase Akt/PKB liegt in drei nahe verwandten, enzymatischen Isoformen vor, Akt-1, -2 und Akt-3, die von drei verschiedenen Genen kodiert werden (14q32, 19q13 und 1q43). Alle drei Isoformen sind weithin verbreitet, ähneln sich in

Struktur und Größe und werden durch einen gemeinsamen Mechanismus aktiviert. Die Aktivierung von Akt/PKB ist ein mehrstufiger Prozess, der sowohl Rekrutierung und Bindung an die Membran als auch Phosphorylierungen beinhaltet (Paez und Sellers, 2003)(Abb.14 und 16). Unmittelbar nach Aktivierung der PI3-Kinase und der Produktion von $PI(3,4,5)P_3$ und $PI(4,5)P_2$ wird Akt/PKB an die Plasmamembran rekrutiert, in dem seine PH-Domäne an D3-phosphorylierte Phosphatidylinositole mit hoher Affinität bindet. Die Aktivierung von Akt/PKB beinhaltet Konformationsänderungen und Phosphorylierung an zwei spezifischen Resten. Der Threonin-308-Rest liegt innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne und wird durch PDK1 (engl.: **P**rotein-**d**eependent kinase 1), ebenfalls eine Serin-/Threoninkinase mit einer PH-Domäne, phosphoryliert. Der Serin-473-Rest liegt innerhalb des C-Terminus, wird vom mTOR-Komplex 2 phosphoryliert und ist für die vollständige und maximale Aktivität von Akt/PKB essenziell (Sarbasov et al., 2005b). Akt/PKB wurde als Proto-Onkogen identifiziert und die direkten Ziele von Akt/PKB schließen zentrale Regulatoren der Apoptose (Bad, Bax, Bim, Caspase-3 und -9), der Proliferation ($p21^{CIP1}$; $p27^{KIP1}$), des Zellwachstums (mTOR), des Zellüberlebens (XIAP, Bcl-2, Mdm2/p53), des Metabolismus (GSK-3 β), wichtige Transkriptionsfaktoren (FoxO; NF- κ B) sowie andere Regulatoren (eNOS, Lamin A, Huntingtin, Ataxin-1) mit ein (Paez und Sellers, 2003).

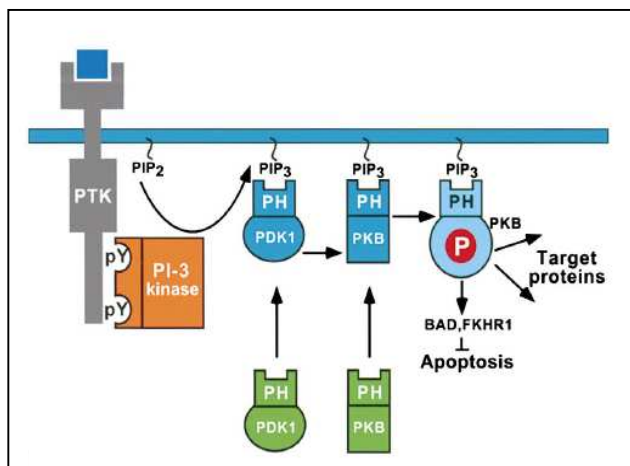


Abbildung 16: Aktivierungsmechanismus von Akt/PKB

Die Translokation von PDK1 und Akt/PKB an die Plasmamembran ist ein notwendiger Schritt für die Aktivierung. PIP_3 dient als Bindungsstelle für die PH-Domäne von PDK1 und Akt/PKB. Die Phosphorylierung an zwei spezifischen Phosphorylierungsstellen (an Serin-473 durch den mTORC2/PDK2 und an Threonin-308 durch PDK1) führt zur vollständigen Aktivierung von Akt/PKB (Schlessinger, 2000).

Die Proteinkinase mTOR gehört zur Familie der PIKKs und wird ubiquitär exprimiert. Neben der konservierten, katalytischen Kinasedomäne verfügt mTOR über eine Rapamycin-Bindungsdomäne. Der mTOR-Signalweg reguliert Zellproliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben der Zellen. Die Aktivität von mTOR wird

durch Bindung verschiedener Proteine vermittelt, was zur Bildung von zwei individuellen Komplexen, einem Rapamycin-sensitiven und einem Rapamycin-resistenten Komplex, mit unterschiedlichen Funktionen führt.

Im mTOR-Komplex 1 (mTORC1) bindet mTOR das Protein Raptor (engl.: **r**egulatory-**a**ssociated **p**rotein of **mTOR**), wird durch PI3K-Akt/PKB aktiviert, was zur Aktivierung und Phosphorylierung der ribosomalen S6-Kinase und des 4E-BP1 (engl.: eukaryotic translation initiation factor **4E-binding protein 1**) führt. Der mTORC1 reguliert verschiedene Signalwegseffektoren und Transkriptionsfaktoren, die dann die Translation, die ribosomale Biogenese, den Metabolismus, die Proliferation, die zelluläre Antwort auf Hypoxie und den Prozess der Autophagie regulieren. Der mTOR-Komplex 2 (mTORC2) besteht aus mTOR gebunden an das Protein Rictor (engl.: **r**apamycin-**i**nsensitive **c**ompanion of **mTOR**). Der mTORC2 phosphoryliert Akt/PKB an Serin-473 und sorgt somit für eine umfassende Aktivierung von Akt/PKB. Der mTORC2 ist maßgeblich an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Dancey, 2010).

Veränderungen im PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweg

Einige Komponenten dieses Signalweges sind in verschiedenen Krebsarten verändert. Mutationen im PIK3CA Gen, welches die katalytische Untereinheit von PI3K (p110 α) kodiert, sind häufig in Brust- (37%), Endometrium- (24%) und Kolonkarzinomen (15%) anzutreffen. Eher seltener (<10%) treten diese Mutationen in Melanomen, Pankreas-, Prostata- und Lungenkrebs auf. Bemerkenswert ist, dass über 80% der PIK3CA Mutationen zwei Hotspotmutationen sind, die zu einem konstitutiv aktiven Signalweg führen (Vivanco und Sawyers, 2002; Chen et al., 2012). Somatische Mutationen im Tumorsuppressor PTEN sind häufig in Tumoren des Endometriums, des zentralen Nervensystems (ZNS), der Haut und in Prostatakarzinomen zu finden. Zu den auftretenden Mutationen zählen der Verlust der Heterozygotie, die Inhibition der Phosphatase-Aktivität sowie Punktmutationen, die die Ubiquitinierung von PTEN beeinflussen und so die Translokation in den Kern verhindern. Zu den Akt Mutationen zählen Akt-2 Amplifizierung in Ovarial- und Brustkarzinomen. Zusätzlich wurden über Mutationen in Akt-1 in einigen Brust-, Kolorektalen- Haut- und Ovarialtumoren berichtet. Eine Punktmutation (E17K) in der PH-Domäne von Akt-1 wurde in einem geringen Prozentsatz (2-8%) von Brust-, Kolorektal- und Ovarialkarzinomen gefunden. Dieselbe aktivierende Punktmutation (E17K) konnte auch in Akt-3 in zwei Melanomzelllinien und in einem Patienten mit Melanom aufgezeigt werden (Davies et al., 2008). In Pankreaskarzinomzellen wurde eine Akt-2 Überexpression nach dem Verlust von PTEN nachgewiesen (Altomare et

al., 2003). PI3K und Akt Mutation schließen sich gegenseitig aus. Eine konstitutive Aktivierung von PI3K und Akt konnte mit einer vermehrten Resistenz gegen Paclitaxel, Doxorubicin und 5-Fluorouracil in Verbindung gebracht werden (Downward, 2004; Carpten et al., 2007; Hafsi et al., 2012).

Bis dato wurden keine mTOR-Mutationen in humanen Tumoren entdeckt, nur Fehlfunktionen bzw. Mutationen in den oben genannten Signalwegskomponenten, die zu einer Hyperaktivierung von mTOR in benignen und malignen neoplastischen Erkrankungen (Nierenzelltumore, Brustkarzinome, NSCLC, Melanom) führen (Guertin und Sabatini, 2005; Bundscherer et al., 2008; Dancey, 2010).

Regulierung der Proteinkinasen des PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalwegs

Die an der Tumorgenese beteiligten Proteinkinasen stellen Angriffspunkte für diverse Inhibitionsstrategien dar. Dabei handelt es sich sowohl um natürliche Inhibitoren als auch um synthetische, niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper. Die Phosphatidylinositol-Level unterliegen einer strengen Regulation durch natürliche Inhibitoren, den PIP₃-Phosphatasen (PTEN, SHIP1, SHIP2). PTEN (engl.: **Phosphatase and tensin** homolog deleted on chromosome 10) wirkt dem PI3K-Signalweg entgegen. Ursprünglich wurde PTEN als Tumorsuppressor in Brustkrebs und Glioblastomen entdeckt. PTEN entfernt einen Phosphatrest an der 3'-Position von PI(3,4,5)P₃ und konvertiert es in PI(4,5)P₂ zurück. Die SHIP-Phosphatasen (engl.: **SH2**-domain-containing inositol 5-phosphatase) greifen auch PI(3,4,5)P₃ an, entfernen allerdings einen Phosphatrest von der 5'-Position um so PI(3,4)P₂ zu generieren (Fruman, 2010).

Niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren (engl.: „small molecules“) sind synthetische Verbindungen, die durch kompetitive oder irreversible Bindung an die ATP-Bindungstasche die Aktivität von Kinasen hemmen können. PI3-Kinasen vom Typ I werden durch den hochpotenten Inhibitor Wortmannin blockiert. Wortmannin wird aus dem Pilz *Penicillium funiculosum* gewonnen und gehört zur Substanzklasse der steroiden Furane. Es hat eine immunsuppressive und stark entzündungshemmende Wirkung. Wortmannin bindet kovalent über seinen Furanring an einen Lysinrest (Lys⁸⁰²) in der ATP-Bindungsstelle der p110-katalytischen Untereinheit von PI3K. Die irreversible Inhibition der PI3K beinhaltet die Bildung eines vinyliischen Carbamates durch den Angriff der Lysin-Seitenkette auf den Furanring von Wortmannin (Wipf und Halter, 2005). In klinischen Studien wird das synthetisch modifizierte Wortmannin PX-866 als experimenteller Wirkstoff eingesetzt. PX-866 zeigte signifikante Antitumor-Aktivität in Xenotransplantat-Modellen (Chen et al., 2012). Zudem laufen einige Phase-II-Studien mit PX-866 als Mono- und

Kombinationstherapie in Glioblastomen, kolorektalen Karzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen (Quelle: www.clinicaltrials.gov).

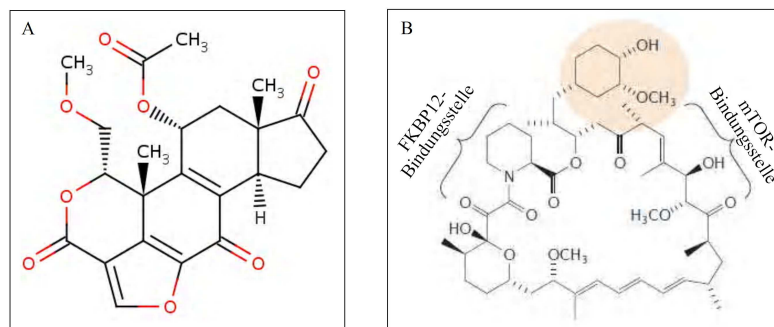


Abbildung 17: Chemische Strukturen der PI3K-Akt/PKB-mTOR-Signalwegsinhibitoren.

(A) Chemische Struktur des PI3K-Inhibitors Wortmannin. (B) Chemische Struktur des mTOR-Inhibitors Rapamycin. Die Klammern bezeichnen die FKBP12-Bindungsstelle (links) und die Bindungsstelle von mTOR (rechts).

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin (Sirolimus) ist ein natürliches Fungizid, das aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde. Neben der immunsuppressiven Wirkung konnte in vorklinischen Untersuchungen gezeigt werden, dass Rapamycin zudem antitumorale Aktivität besitzt (Bundscherer et al., 2008). Rapamycin kann, in Abhängigkeit von der Konzentration, sowohl den mTORC1 als auch den mTORC2 in einigen Krebszelllinien inhibieren. Der mTORC1 wird im nM-Bereich, mTORC2 im niedrigen μ M-Konzentrationsbereich inhibiert. Rapamycin bindet an seinen intrazellulären Bindungspartner, das Immunophilin FKBP12, und dieser Komplex bindet an und inhibiert mTOR. Der FKBP12-Rapamycin-Komplex inhibiert die Kinaseaktivität des Raptor-mTOR-Komplexes durch Destabilisierung der Raptor-mTOR-Bindung. Dies geschieht durch eine Konformationsänderung in mTOR, was die Bindung an Raptor und somit die Möglichkeit zur Substratrekrutierung schwächt. Im mTORC2 blockiert Rictor normalerweise die FKBP12-Rapamycin Bindungsstelle. In der Klinik wird Rapamycin als Immunsuppressivum zur Verhinderung von Organabstoßungen nach Transplantationen verwendet (Sarbasov et al., 2005a). Im Mausmodell zeigte Rapamycin eine potenziell positive Wirkung gegen die Symptome der Alzheimer-Krankheit. Durch eine Inhibition von mTOR mittels Rapamycin reduzierte sich die Konzentration von β -Amyloid (Caccamo et al., 2010).

Bis jetzt gibt es drei analoge Substanzen zu Rapamycin, sogenannte Rapaloga, die in klinischen Studien eingesetzt werden. Dazu gehören Temsirolimus (CCI-779), Everolimus (RAD001) und Ridaforolimus. Und obwohl über Veränderungen im PI3K-Akt/PKB-mTOR-Signalweg in bis zu 60% aller kutanen Melanome berichtet wurde, haben sich die spezifischen Inhibitoren dieses Signalweges als nicht effizient genug in der klinischen Anwendung erwiesen (Nikolaou et al., 2012). Mittlerweile ist bekannt, dass Inhibitoren des PI3K-Akt/PKB-mTOR-

Signalweges die antitumorale Aktivität anderer Inhibitoren synergistisch verstärken. Untersuchungen im Melanom-Xenograft Modell mit PI-103 (einem PI3K und mTORC1/2-Inhibitor) in Kombination mit Rapamycin haben eine Reduktion des Tumorwachstums gezeigt (Werzowa et al., 2011) und Phase I/II-Studien mit Temsirolimus und Sorafenib haben erste, vielversprechende Ergebnisse im Melanom veröffentlicht (Nikolaou et al., 2012). Aufgrund der Selektivität, einer eingeschränkten Wirksamkeit sowie der Entwicklung von Resistenzen bleibt künftig, ungeachtet der bisherigen klinischen Fortschritte von Kinaseinhibitoren, in der Tumorthherapie insbesondere in der Melanomtherapie, die Entwicklung von Kinaseinhibitoren für eine effektive Langzeitbehandlung eine bedeutende Herausforderung. Die Kombinationstherapie von Signalwegsinhibitoren oder auch Multikinaseinhibitoren mit Antikörpern wie Ipilimumab oder mit TRAIL oder seinen agonistischen Antikörpern stellen eine mögliche Therapieoption für das maligne Melanom dar. Zahlreiche Versuchsreihen sind dazu bereits gestartet (Überblick über laufende klinische Studien im Anhang, S.156-158).

Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind Transmembranproteine die eine wichtige Rolle in diversen physiologischen Prozessen, wie der Zellproliferation, der Migration, der Neurotransmitter-Freisetzung, der Hormon-Sekretion, der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und in der Tumorgenese, spielen (Kunzelmann, 2005; Schmidt et al., 2010; Basalingappa et al., 2011). Das humane Genom kodiert für acht Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle (KCa), die sich in Abhängigkeit von ihrer genetischen Verwandtschaft, ihrer Leitfähigkeit und dem molekularen Mechanismus der Ca²⁺-Erfassung in drei Klassen unterteilen lassen:

- (1) Gruppe der KCas mit großer Leitfähigkeit (BKs, KCa1.1)
- (2) Gruppe der Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit (SKs, engl.: Potassium channels with small conductance; KCa2.1; KCa2.2; KCa2.3)
- (3) Gruppe der KCas mit einer intermediären Leitfähigkeit (IKs, engl.: Potassium channels with intermediate conductance; KCa3.1).

Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle mit intermediärer Leitfähigkeit oder KCa3.1

Im Genom existiert nur ein KCa3.1 Gene (KCNN4), das für ein Protein mit 427 Aminosäuren kodiert. Der Kanal wurde erstmals 1997 von zwei amerikanischen Gruppen unabhängig voneinander in Pankreaszellen (Ishii et al., 1997) und in CHO-Zellen (Joiner et al., 1997) kloniert und nachgewiesen. Das Protein besteht aus einem kurzen N-Terminus gefolgt

von sechs Transmembrandomänen und einem langen C-terminalen Ende. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär (Abb.18A). Das Protein besteht aus vier α -Untereinheiten, die einen Kanalkomplex ausbilden, in dessen Zentrum sich die symmetrische Kaliumpore befindet (Abb. 18B). Die Kaliumpore, die den Selektivitätsfilter des Kanals darstellt, ist zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 (S5-P-S6) lokalisiert und besitzt ein GYGD-Motiv. Ein Strom durch den Kanal kann erst dann gemessen werden, wenn die Konzentration des intrazellulären, freien Kalziums $[Ca^{2+}]_i > 50-100 \text{ nM}$ ist. Oberhalb dieses Schwellenwertes sind die KCa3.1-Kanäle unabhängig vom Potential der Zelle geöffnet (Wulff et al., 2001; Jensen et al., 2002). Die Öffnung des Kanals wird über Ca^{2+} vermittelt und durch Calmodulin reguliert, welches konstitutiv an den C- Terminus des Kanals bindet. Vier Calmodulin-Moleküle werden benötigt, um die Ca^{2+} - vermittelte Aktivität des KCa3.1-Tetramers aufrechtzuerhalten, das bedeutet, jede Untereinheit des tetrameren Kanals ist mit einem Calmodulin-Molekül assoziiert, welches bis zu vier Ca^{2+} -Ionen binden und so eine Konformationsänderung und Öffnung des Kanals bewirken kann (Fanger et al., 1999).

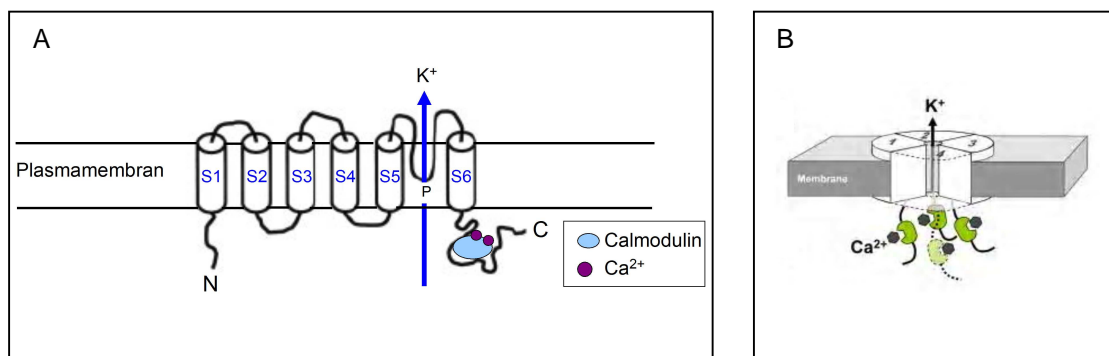


Abbildung 18: Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanal KCa3.1.

(A) Schema einer Untereinheit des KCa3.1. Der N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Der C-Terminus bindet Calmodulin, welches nach Bindung von Ca^{2+} die Öffnung des Kanals reguliert. Der Kanal besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und der Porenregion (P), die den Selektivitätsfilter enthält. (B) Schematische Darstellung eines KCa 3.1-Kanalkomplexes aus vier α -Untereinheiten (Jensen et al, 2002).

Die KCa3.1 Kanäle spielen in der Regulation und Stabilisierung des Membranpotentials, der Ca^{2+} -vermittelten Signalwege, der Aufrechterhaltung des Zellvolumens, der Anionensekretion (vor allem Chlorid- und Hydrogencarbonatanionen) sowie der Progression durch den Zellzyklus, der Proliferation, der Differenzierung und der Migration eine wichtige Rolle. KCa3.1 mRNA Transkripte wurden nahezu ausschließlich in nicht-erregbaren Zellen nachgewiesen. Die Expression von KCa3.1 ist weitverbreitet und konnte in Geweben der Plazenta, Lunge, Prostata, Milz, des Enddarms, des Thymus, des Knochenmarks, in den Speicheldrüsen, den peripheren Blutzellen (Erythrozyten, Blutplättchen, Lymphozyten, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen), den Endothelzellen der Blutgefäße und der Haut gezeigt werden. Keine KCa3.1 Transkripte konnten dagegen im Gehirn, Rückenmark,

Herz, Nebennierenmark, Cortex, Uterus, in der Aorta, Leber, Niere, den Eierstöcken und den Hoden nachgewiesen werden (Wulff et al., 2001; Jensen et al., 2002; Lang et al., 2003). KCa3.1-knockout Mäuse weisen nur einen schwachen Phänotyp auf, da der Verlust von KCa3.1-Kanälen über andere Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle (SKs und BKs) kompensiert werden kann. Die Konsequenzen eines KCa3.1-Knockouts sind Defekte in der intestinalen Chlorid-Sekretion, eine defekte Mastzell-Aktivierung, ein leicht erhöhter Blutdruck und eine verbesserte Glucose-Toleranz (De Marchi et al., 2009; Wulff und Castle, 2010). Nach der weitverbreiteten Lokalisation von KCa3.1-Kanälen auf Plasmamembranen konnte 2009 eine Gruppe aus Italien (De Marchi et al., 2009) auch eine Lokalisation von KCa3.1 auf der inneren Mitochondrienmembran (IMM) nachweisen. Diese mitochondrialen KCa3.1-Kanäle (mtKCa3.1) wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durch patchen von Mitoplasten aufgezeigt. Die mtKCa3.1-Kanäle sind in die IMM integriert, mit der Ca^{2+} -bindenden Domäne und dem N-Terminus auf der Matrix-Seite und der Porenöffnung zum Intermembranraum. Während in der Plasmamembran KCa3.1-Kanäle den Anstieg von Ca^{2+} in Plasmamembran-Hyperpolarisation konvertieren, kommt es in den Mitochondrien zu einer Depolarisation der IMM, durch einen K^+ -Influx der durch den elektrochemischen Gradienten und eine Volumenzunahme gesteuert wird (De Marchi et al., 2009).

Pathophysiologische Rolle der KCa3.1 Kanäle

Da KCa3.1-Kanäle eine entscheidende Rolle in der Regulation von physiologischen Prozessen wie der Proliferation spielen, ist es nicht verwunderlich, dass eine Involvierung von KCa3.1-Kanälen auch in pathophysiologischen Prozessen nachgewiesen werden konnte. Und obwohl bis heute keine humanen Erkrankungen aufgezeigt werden konnten, die eine Mutation im KCa3.1-Kanal aufweisen, konnte doch für diverse Krankheiten eine essenzielle Rolle von KCa3.1-Kanälen belegt werden. Von hoher Relevanz scheinen KCa3.1-Kanäle bei inflammatorischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und vaskulären Erkrankungen, wie Restenosen, Nierenfibrosen, Arteriosklerose und Asthma, zu sein. Ebenso konnte eine Beteiligung von KCa3.1-Kanälen bei Sichelzellanämie, in neuroinflammatorischen Erkrankungen und bei Schädel-Hirn-Traumata gezeigt werden (Wulff und Castle, 2010). Da KCa3.1-Kanäle eine wichtige Rolle in der Proliferation verschiedener Zelltypen spielen, überrascht es nicht, dass eine Beteiligung des Kanals in der Entwicklung verschiedener Tumorarten berichtet wurde. Hohe Expressionslevel von KCa3.1 konnten in Plasmamembranen verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden, so in Gliom-, Melanomzellen, in Prostata-, Pankreas-, Brust-, Endometrium- und Kolonkarzinomzellen (Jager et al., 2004; Schonherr, 2005; De Marchi et al., 2009).

Regulation von KCa3.1

Die Lokalisation der KCa3.1-Kanäle wird durch Modulation des Membran- und Protein-Transportsystems reguliert (Sassi et al., 2010). Die KCa3.1-Transkription und Expression kann durch die Transkriptionsfaktoren AP-1 (engl.: **activation protein-1**) und REST (engl.: **repressor element-1 silencing transcription factor**) reguliert werden. Auf Proteinebene kann die Funktion von KCa3.1 durch die Kinasen PKA (**Proteinkinase A**) und NDPK-B (engl.: **nucleoside diphosphate kinase-B**) erhöht oder durch die Histidin-Phosphatase PHPT1 inhibiert werden. NDPK-B und PHPT1 sind dabei in der Lage, durch direkte Phosphorylierung/ Dephosphorylierung der Histidinreste (His³⁵⁸) im C-Terminus, die Funktion von KCa3.1 zu beeinflussen (Wulff und Castle, 2010). In aktivierten T-Lymphozyten, Pankreaskarzinomzellen, Melanomzellen und Glioblastomzellen konnte eine dramatische Zunahme der Expression (um etwa das 100-fache) von KCa3.1, im Vergleich zu normalen Zellen, gezeigt werden (Jager et al., 2004; Schonherr, 2005; Lallet-Daher et al., 2009; Ruggieri et al., 2012). In Brustkrebszellen wurde nachgewiesen, dass die KCa3.1-Expression Zellzyklusabhängig ist (Oquadid-Ahidouch et al., 2004) und in Pankreas- und Kolonkarzinomzellen war eine Zunahme der KCa3.1-Expression auf die mitogene Aktivierung des Ras/ERK-Signalweges zurückzuführen (De Marchi et al., 2009; Lallet-Daher et al., 2009).

Inhibition der KCa3.1-Kanäle

Angesichts des breitgefächerten Expressionsprofils und der zentralen Rolle von KCa3.1-Kanälen in verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, scheint die Entwicklung von KCa3.1-Kanalinhibitoren eine naheliegende Strategie zu sein. Zu den verfügbaren Inhibitoren von KCa3.1-Kanälen zählen die zwei Skorpiongifte Charybdo- und Maurotoxin. Sowohl Charybdotoxin, ein Neurotoxin das von *Leiurus quinquestriatus hebraeus* produziert wird, als auch Maurotoxin (produziert von *Scorpio maurus palmatus*) blockieren KCa3.1-Kanäle jedoch nicht selektiv, da sie auch spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv1.3 und Kv1.2) und KCa1.1 (BK) inhibieren. Zusätzlich werden KCa3.1-Kanäle durch eine Reihe von Medikamenten inhibiert, die ursprünglich für andere Krankheiten zugelassen und erprobt wurden, wie das Malariamittel Chinin, der Vasodilatator Cetedil oder das Breitbandantimykotikum Clotrimazol (Wulff und Castle, 2010). Clotrimazol wurde sowohl in experimentellen Tiermodellen, als auch in klinischen Studien zur Behandlung von Sichelzellanämie eingesetzt. Bedauerlicherweise eignet sich Clotrimazol nicht zur Langzeittherapie, da es eine hohe Affinität zu den Cytochrom P450-abhängigen Enzymen (z.B. CYP3A4) aufweist. Durch die inhibitorische Wirkung von Clotrimazol auf die

P450-abhängigen Enzyme kommt es zu starken Nebenwirkungen wie Leberzytotoxizität, irreversiblen Leberschäden und zu drastischen Veränderungen im Cortisolspiegel.

Allerdings wurde Clotrimazol von der Arbeitsgruppe um Heike Wulff (San Diego, Kalifornien) als Vorlage für die Synthese diverser Triarylmethane verwendet. Eines dieser Triarylmethane (TRAM-34, 1-[(Chlorophenyl)diphenylmethyl]1-H-Pyrazol) erwies sich als selektiver Inhibitor für die KCa3.1-Kanäle, ohne die P450-abhängigen Enzyme zu inhibieren. TRAM-34 inhibiert KCa3.1 mit einem IC_{50} von 20 nM und verfügt über eine 500-1000-fach erhöhte Selektivität gegenüber Kv-Kanälen, BK- und SK-Kanälen (Wulff et al., 2000; Wulff et al., 2001). TRAM-34 ist durch seine hohe Lipophilie membranpermeabel. Wie Clotrimazol, so blockiert auch TRAM-34 den KCa3.1-Kanal innerhalb der selektiven Kanalpore durch Interaktionen mit zwei spezifischen Aminosäureresten. Die Bindungsstelle für TRAM ist in der S5-P-S6 Region lokalisiert und ein Threoninrest in S5 (Thr²⁵⁰) sowie ein Valinrest in S6 (Val²⁷⁵) wurden als absolut essenziell für die Bindung von TRAM-34 identifiziert. Beide Aminosäurereste flankieren einen großen, wassergefüllten Hohlraum, der knapp unter dem Selektivitätsfilter (GYG-Motiv) des Kanals liegt.

Da der Kanal selbst als Tetramer vorliegt, kann die TRAM-Bindungsstelle Threonin/Valin von mehr als einer Untereinheit beinhalten. Die Selektivität der KCa3.1-Kanäle für TRAM-34 ergibt sich wahrscheinlich aus der stabilen Interaktion des propellerförmigen TRAM-34 mit den Aminosäuren Threonin und Valin. Die π -Elektronenwolken der Phenylringe von TRAM-34 bilden hydrophobe Interaktionen mit den positiv polarisierten Wasserstoffatomen der Methylgruppe von Threonin. Die Interaktionen mit Valin läuft ebenfalls über hydrophobe Interaktionen, ist aber abhängig von der Größe des Restes (Wulff et al., 2001).

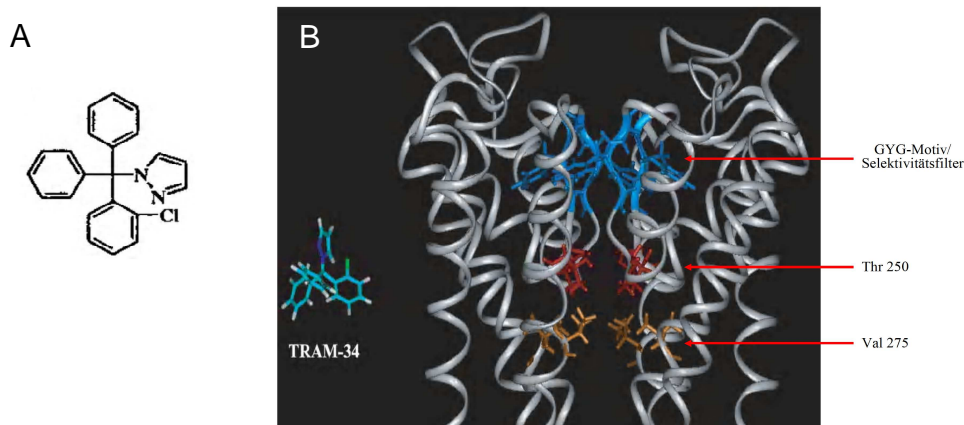


Abbildung 19: Die Bindung von TRAM-34 an den KCa3.1.

(A) Struktur des TRAM-Moleküls. Das TRAM-Pharmakophor besteht aus zwei Teilen, einer funktionellen Gruppe aus drei Phenylringen und einer heterozyklischen Gruppe (Wulff et al., 2001). (B) Modell der KCa3.1-Struktur mit der Bindungstasche von TRAM-34. Nur der obere Teil der Porenregion des Kanals ist zu sehen. Das GYG-Motiv, das den Kalium-Selektivitätsfilter bestimmt, ist in hellblau, Threonin²⁵⁰ in rot und Valin²⁷⁵ in kupfer dargestellt. Es sind nur zwei Untereinheiten gezeigt, um den internen Hohlraum deutlicher herauszustellen. Die drei Phenylringe von TRAM-34 (Cyan) interagieren mit Threonin und Valin (Wulff et al., 2001).

Parallel zu TRAM-34 wurde ein fluoriertes Triphenyl-Acetamid als KCa3.1-Inhibitor (ICA-17043 = Senicapoc) von einer amerikanischen Firma (Icagen Inc.) entwickelt. Senicapoc inhibiert KCa3.1 mit einem IC₅₀ von 11 nM und zeigt eine orale Bioverfügbarkeit/Halbwertszeit von 12,8 Tagen.

Experimentelle und klinische Anwendung von KCa3.1-Inhibitoren

Die Inhibition von KCa3.1-Kanälen mit TRAM-34 verhinderte die Proliferation von Prostatakarzinomzellen durch eine vermehrte Expression von p21^{CIP1} und in Brustkrebszellen kam es zu Membrandepolarisation und Zellzyklusarrest in der frühen G1-Phase (Ouadid-Ahidouch et al., 2004; Lallet-Daher et al., 2009). In Tiermodellen haben TRAM-34 und Senicapoc gezeigt, dass sie experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE, ein T-Zell vermitteltes Krankheitsmodell mit den Symptomen einer Multiplen Sklerose) verhindern und die inflammatorische Antwort, bei rheumatoider Arthritis, in Mäusen inhibieren (Wulff und Castle, 2010). Die Behandlung mit Clotrimazol oder TRAM-34 hat einen zytostatischen Effekt auf diverse Tumorzelllinien und beeinträchtigt die Progression/Entwicklung von Melanom- und Endometrium-Xenograft-Modellen. Die Behandlung von SCID-Mäusen mit Clotrimazol führte zu einer verminderten Anzahl von Lungenmetastasen, die sich aus Primärtumoren humaner Melanomzellen entwickelt haben (Benzaquen et al., 1995). Die Behandlung von Nacktmäusen, denen humane Endometriumkarzinomzellen injiziert wurden, mit TRAM-34 zeigte ebenfalls ein vermindertes Tumorstadium (Wang et al., 2007). Die Blockierung von KCa3.1-Kanälen mit TRAM-34 in

einem Mausmodell zeigte verminderte Artherosklerose durch Reduktion der Proliferation der glatten Muskelzellen (engl.: smooth muscle cells) und verminderte Lymphozyten-Infiltration. Zudem führte die Blockierung von KCa3.1 zu einer supprimierten Angiogenese (Wulff und Castle, 2010). Die Kombination von TRAM-34 mit einem blockierenden Peptid für den spannungsabhängigen Kv1.3-Kanal verminderte die T-Zell- und Makrophagen-Infiltration in einer frühen Phase der Organabstoßung nach Nierentransplantation in Ratten.

Für Senicapoc gibt es mittlerweile sowohl Phase I- und Phase II-Studien in Patienten mit Sichelzellanämie, die vielversprechende Ergebnisse zeigen. Diese initialen klinischen Versuche haben gezeigt, dass es gut verträglich ist, die KCa3.1-Kanäle blockiert und damit auch biologische Effekte hervorruft. Blockierung der KCa3.1-Kanäle verhindert den starken Verlust von zellulärem Wasser und damit die Dehydrierung, das Einschrumpfen der Erythrozyten, reduzierte die Hämolyse und erhöhte die Hämoglobin-Level in Patienten mit Sichelzellanämie.

Zudem sind KCa3.1-Kanäle auch ein attraktives Ziel für Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen mit einer inflammatorischen Komponente, durch Blockierung der Zellproliferation. Vorstellbar ist aber auch ein Einsatz der KCa3.1-Inhibitoren in der Tumorthherapie (Wulff und Zhorov, 2008; Wulff und Castle, 2010).

Fragestellung

Das metastasierte maligne Melanom gehört zu den aggressivsten und therapieresistentesten Tumorentitäten. Es gilt aufgrund seiner hohen Mortalität als ein wichtiger Modelltumor. Leider gibt es derzeit noch wenig wirksame Therapien, daher ist ein besseres Verständnis der Apoptoseregulation, der Mechanismen der Resistenzentwicklung sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze von hoher medizinischer Bedeutung.

Neben den neu zugelassenen Therapeutika wie Vemurafenib (BRAF^{V600E}-Inhibitor) und Ipilimumab (anti-CTLA-4-Antikörper), weisen TRAIL und die agonistischen Antikörper gegen die TRAIL-Rezeptoren ein hoffnungsvolles therapeutisches Potential auf. Der apoptotische Effekt von TRAIL beruht auf der Fähigkeit selektiv eine Vielzahl von Krebszellen zu töten, während normale Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Ungeachtet dessen, entwickeln Melanomzellen häufig eine TRAIL-Resistenz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer repräsentativen Auswahl von Melanomzelllinien mittels verschiedener Signalwegsinhibitoren die TRAIL-Resistenz zu überwinden und für die TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren. Neben Wortmannin und Rapamycin, Kinaseinhibitoren des PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweges, wurde TRAM-34, ein Inhibitor für die Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanäle (KCa3.1), verwendet. Untersucht wurden neben der inhibitorischen Wirkung der Substanzen auch deren Effizienz in der Apoptoseinduktion, Auswirkungen auf die Zytotoxizität und auf die Zellproliferation. Zur Klärung der Wirkmechanismen wurde die Caspasenkaskade, der mitochondriale Apoptosesignalweg, die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) auf die Apoptose und die Involvierung verschiedener Bcl-2-Proteine, insbesondere die Rolle von Bax, untersucht. Im Falle von TRAM-34 sollte zudem mittels Interaktionsstudien die Bindung des Kanals an Bcl-2-Proteine, insbesondere Bax, bestimmt werden.

Das Projekt sollte zum besseren Verständnis der TRAIL-Resistenz im malignen Melanom und deren Überwindung mittels verschiedener Inhibitoren beitragen, um so mögliche therapeutische Angriffspunkte identifizieren und definieren zu können. Hauptziel dieser Arbeit war es eine Grundlage zur möglichen therapeutischen Nutzung von TRAIL in Kombination mit Kinaseinhibitoren des PI3K-Akt/PKB-mTOR-Signalweges und dem Kaliumkanalinhibitor TRAM-34 zu schaffen. Diese könnte sich auf agonistische Antikörper der TRAIL-Rezeptoren, die bereits in klinischen Studien eingesetzt wurden und werden, in Kombination mit den ausgewählten Inhibitoren stützen.

Ergebnisse

Strategie I - Sensitivierung durch den Kaliumkanalinhibitor TRAM-34

Nachweis von KCa3.1 (IK1) in diversen Melanomzelllinien

Eine signifikante Expression des KCa3.1-Kanals konnte in sechs verschiedenen Melanomzelllinien gezeigt werden. Als Negativkontrollen wurden sowohl HEK-293 Zellen, die zuvor in einer real-time PCR Analyse als KCa3.1 negativ getestet wurden, als auch mit einem Mock-Plasmid transfizierte Zellen verwendet. Zudem wurden HEK-293 Zellen transient mit einem KCa3.1-Plasmid transfiziert, um die Expression von KCa3.1 (46 kDa) wieder herzustellen und die Spezifität des KCa3.1-Antikörpers nachzuweisen (Abb. 20A). Zusätzlich wurde die Expression der KCa3.1 mRNA mit Hilfe der real-time PCR in verschiedenen Melanomzellen überprüft und hier wurde bestätigt, dass HEK-293 Zellen als KCa3.1 negativ einzuordnen sind (Abb. 20B). Um die Funktionalität des Kanals selbst zu untersuchen und zu überprüfen, wurden elektrophysiologische Ableitungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht. Hier wurden lineare Kaliumströme nach Anwendung eines Spannungsrampen-Protokolls in A-375 Zellen aufgezeichnet. Nach Zugaben von TRAM-34 wurde eine sofortige Reduktion des Stroms aufgezeichnet (10 nA \rightarrow 2 nA; Abb. 20C) und der KCa3.1 wurde daraufhin als vorherrschender Kaliumkanal in A-375 Zellen eingestuft. Eine zeitliche Ableitung des Stroms zeigte einen sofortigen Strom-Abbruch nach Zugabe von TRAM-34 (Abb. 20D).

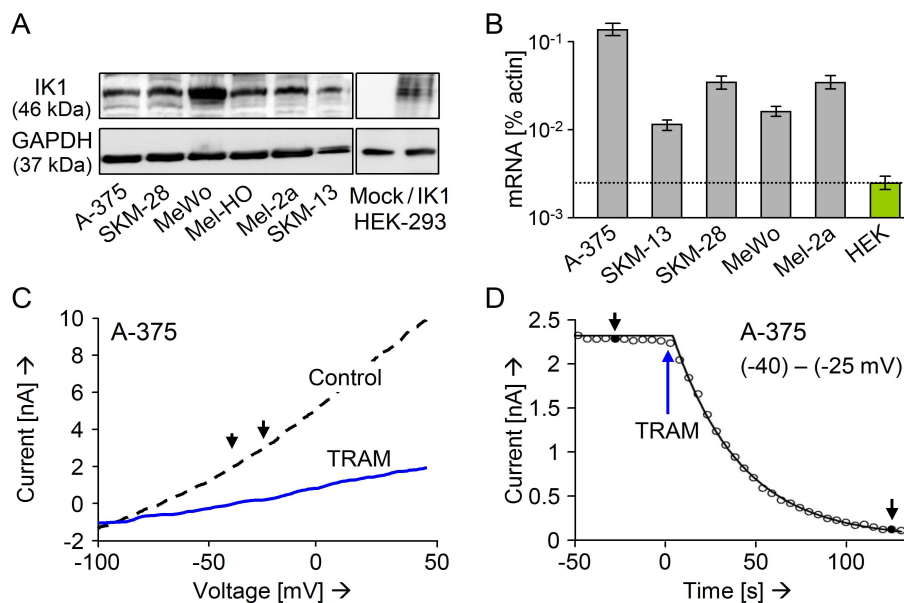


Abbildung 20: Nachweis von KCa3.1-Kanälen in Melanomzelllinien.

(A) In sechs verschiedenen Melanomzelllinien konnte die Proteinexpression von KCa3.1 (IK1) gezeigt werden. Als Negativkontrolle dienten Mock-transfizierte HEK-293 Zellen, als Positivkontrolle KCa3.1-transfizierte HEK-293 Zellen. Eine gleichmäßige Protein-Beladung (30 μ g pro Bahn) wurde mit GAPDH überprüft. (B) Expression der KCa3.1 (IK1) mRNA in mehreren Melanomzelllinien wurde mit der Echtzeit

(real-time) PCR-Analyse bestimmt. Der Schwellenwert der KCa3.1-negativen HEK-293 Zellen ist eingezeichnet (gestrichelte Linie). Die Werte wurden auf β -Aktin normalisiert. (A, B) Die Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse. (C) Spannungsabhängige Kaliumströme wurden in TRAM-34 behandelten A-375 Zellen aufgenommen und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Der Spannungsbereich, der für die nachfolgende Zeitkinetik verwendet wurde, ist angegeben. (D) Zeigt eine Zeitkinetik von Kaliumströmen in A-375 Zellen nach Zugabe von TRAM-34 ($t = 0$). Die kleinen Pfeilköpfe zeigen das Zeitintervall, das für die Bestimmung der Strom-Spannungs-Abhängigkeit benutzt wurde.

Antiproliferative Effekte von TRAM-34

In Zellzyklus- und Proliferationsanalysen konnten die antiproliferative Effekte von TRAM-34 deutlich gezeigt werden. Die Behandlung von A-375 Zellen für 24 h mit $40 \mu\text{M}$ TRAM-34 führte zu einem partiellen G1-Arrest und einer Verminderung der S-Phase (Abb. 21A). Eine dosisabhängige Abnahme des Zellwachstums konnte in A-375 und Mel-HO Zellen mit Hilfe des WST-1 Assays gezeigt werden. Um diese Effekte noch deutlicher hervorzuheben wurde eine Echtzeit-Zellanalyse gemacht, bei der über einen Zeitraum von bis zu 96 h kontinuierlich Zellwachstum und Zelladhäsion untersucht werden können. Direkt nach Zugabe von TRAM-34 zeigte sich eine deutliche Reduktion des Zellwachstums, welche auch nach 72 h noch anhaltend war (Abb. 21 B-D).

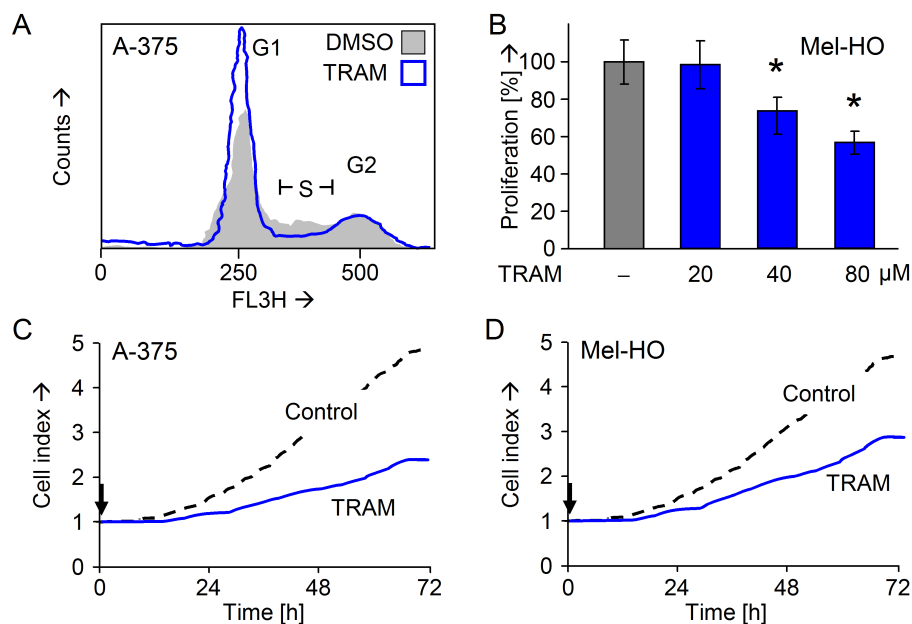


Abbildung 21: Antiproliferative Effekte von TRAM-34.

(A) Zellzyklusanalysen von TRAM-34 behandelten A-375 im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen. (B) Mit Hilfe des WST-1 Assays konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung der Zellproliferation in Mel-HO Zellen gezeigt werden. Mittelwerte und Standardabweichungen (SDs) aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachwerten sind gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Studentischem t-Test berechnet und bei einem p-Wert $< 0,005$ mit * gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz ist gegeben, wenn man die TRAM-34 behandelten Zellen mit den DMSO-behandelten Kontrollen vergleicht. (C, D) Wachstumskurven von A-375 und Mel-HO nach Behandlung mit TRAM-34 im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen, gemessen mit der Echtzeit-Zellanalyse. Die Zellindizes wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ normalisiert.

TRAM-34 sensitiviert für die Todesliganden-induzierte Apoptose

Um eine Strategie zu finden, wie auftretende TRAIL-Resistenzen in Melanomzellen zu brechen sind, wurde eine Reihe von TRAIL-sensitiven und TRAIL-resistenten Melanomzelllinien untersucht. Zusätzlich wurden Zellpopulationen von A-375, Mel-HO und SK-Mel-13 untersucht, die eine induzierbare Resistenz nach kontinuierlicher Kultivierung mit TRAIL aufwiesen. Dies führte zu selektiert-resistenten Zelllinien, die im Nachfolgenden als TRAIL-selektierte (-TS) Zelllinien auftauchen (A-375-TS, Mel-HO-TS und SK-Mel-13-TS).

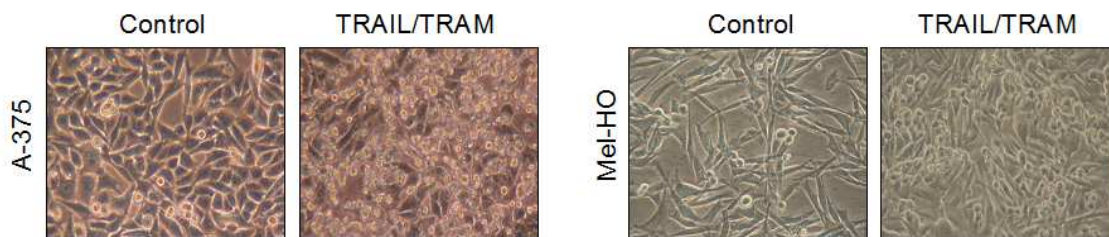


Abbildung 22: Durchlichtbilder zur Apoptoseinduktion in A-375 und Mel-HO Zellen.

Behandlung mit 40 μ M TRAM-34 + 20 ng/ml TRAIL führt zu einer Induktion der Apoptose, die anhand der abgerundeten und abgelösten Zellen zu sehen war.

Eine Quantifizierung von apoptotischen, hypodiploiden Zellen (sub-G1-Zellpopulation) erfolgte mittels einer durchflusszytometrischen Analyse von Propidiumjodid (PI) gefärbten Zellkernen nach einem Protokoll von Nicoletti (Riccardi und Nicoletti, 2006). Erstaunlicherweise zeigte TRAM-34 trotz seiner antiproliferativen Effekte keinerlei Effekt bei der Apoptoseinduktion nach 24, 48 oder 72 h. Die Kombination von TRAM-34 und TRAIL zeigte eine starke Zunahme der Apoptose sowohl in sensitiven als auch resistenten Zellen. In den sensitiven Zelllinien A-375, Mel-HO, SK-Mel-13 und SK-Mel-28 konnte eine Zunahme der Sub-G1-Population auf 18% bis 70% nachgewiesen werden. Auch die TRAIL-selektierten und damit TRAIL-resistenten Zelllinien waren empfänglich für die Kombinationsbehandlung und zeigten Apoptoseraten zwischen 13% und 60%. Behandlung der permanent TRAIL-resistenten Zellen (Mel-2a und MeWo) führte zu einer Apoptoseinduktion von bis zu 15% (Abb. 23, Abb. 25A).

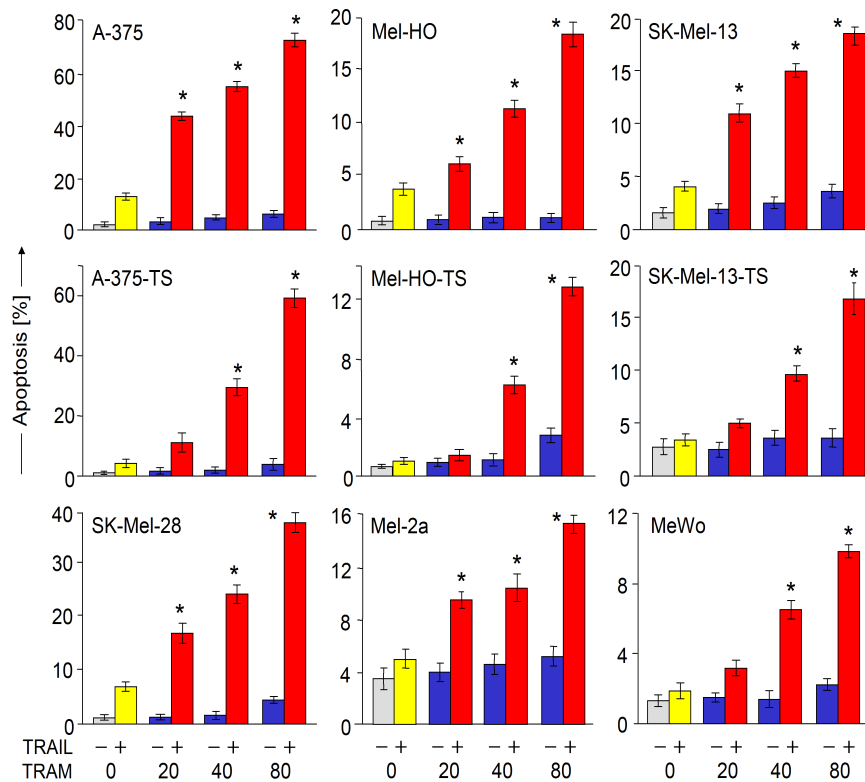


Abbildung 23: Sensitivierung von Melanomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose.

Die Induktion der Apoptose (Prozentsatz von sub-G1 Zellen) wurde in neun Melanomzelllinien mit Hilfe der Zellzyklusanalyse untersucht. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen TRAM-34 +/- TRAIL behandelt. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, jeweils mit Triplikaten, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,005$) und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen im Vergleich zu TRAIL-behandelten Zellen.

Offensichtliche Effekte der Apoptose waren die reduzierte Zellzahl sowie die abgerundeten und abgelösten Zellen. Die morphologischen Charakteristika der Apoptose, wie die Fragmentierung der nukleären DNS und die Chromatinkondensation, wurden mit Hilfe der Bisbenzimid-Färbung in A-375 und A-375-TS Zellen sichtbar gemacht (Abb. 24A). Die Zählung der positiv gefärbten Zellen wiesen vergleichbare Apoptoseraten von etwa 55% in A-375 und von etwa 40% in A-375-TS (Abb. 24B).

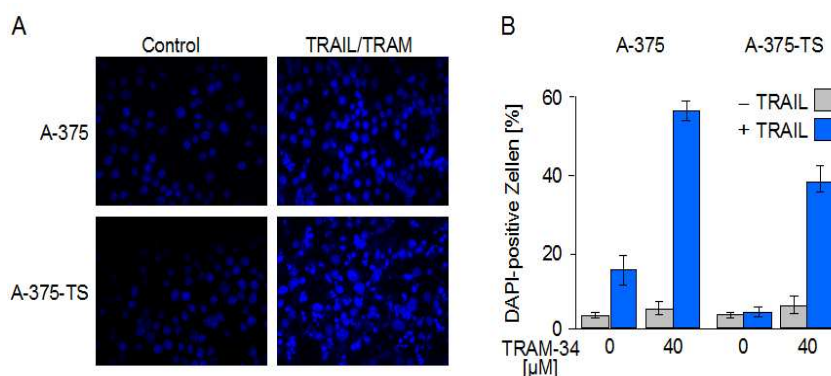


Abbildung 24: Bisbenzimid-Färbung von A-375 und A-375-TS Zellen.

(A) Bisbenzimid-Färbung von A-375 und A-375-TS Zellen und (B) dessen Quantifizierung nach Behandlung mit 40 μM TRAM +/- 20 ng/ml TRAIL für 24 h. Deutlich sind Zellen mit fragmentierten Kernen und kondensiertem Chromatin zu sehen, die für eine Apoptoseinduktion sprechen.

Die Zytotoxizität wurde durch die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung in das Zytoplasma parallel zu der Apoptoseuntersuchung photometrisch bestimmt. Generell konnte nach 24 h nur eine geringe Zytotoxizität durch die Kombinationsbehandlung von TRAM-34 und TRAIL nachgewiesen werden, die zu späteren Zeitpunkten etwas anstieg, was aber als sekundäres Ereignis zu werten ist (Abb. 25C). Die proapoptotischen Effekte von TRAM-34/TRAIL führten zu einer stark verminderten Zellproliferation, die mittels WST-1-Untersuchung in A-375 und A-375-TS bestimmt wurde. Wohingegen die Monobehandlung mit TRAIL zu einem Abfall der Zellproliferation von 25% in A-375 führte und in A-375-TS keinerlei Effekt zeigte, führte die Kombination aus TRAM-34 und TRAIL zu einer starken Verminderung der Proliferation von 95% in A-375 und von 75% in A-375-TS Zellen (Abb. 25B).

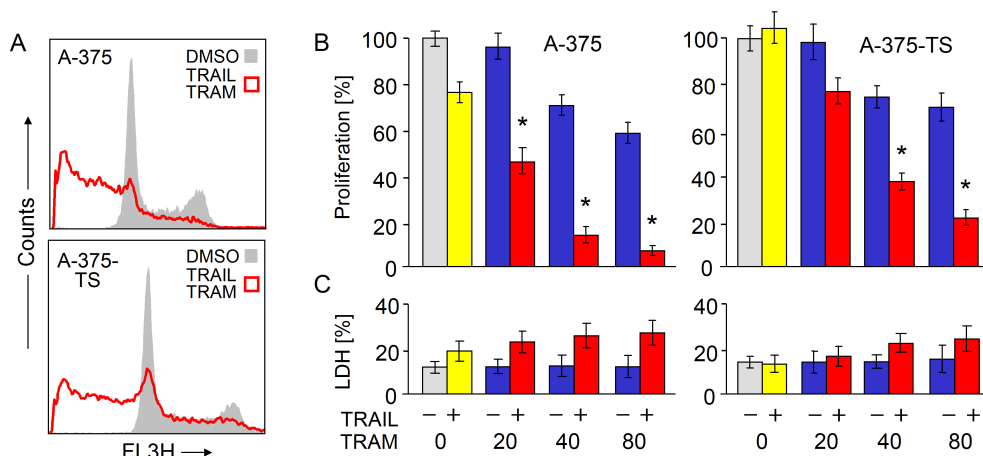


Abbildung 25: Auswirkungen von TRAM-34/TRAIL auf die Proliferation.

(A) Die Auswertung der Zellzyklus-Analysen mit Hilfe der Histogramme zeigen die Apoptoseinduktion (Zunahme der sub-G1 population, roter Graph) in A-375 und A-375-TS nach Behandlung mit 40 μM TRAM-34 und TRAIL (offener Graph, rot) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen (graue, gefüllte Graphen). (B, C) Für A-375 und A-375-TS wurde sowohl die Zellproliferation mittels WST-1-Assay (B) als auch die Zytotoxizität mittels LDH-Assay (C) bestimmt. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentration TRAM-34 (20-80 μM) +/- 20 ng/ml TRAIL behandelt. (B) Dargestellt sind sie Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt wurden. Die Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen im Vergleich zu TRAIL-behandelten Zellen.

Neben der Sensitivierung für den Todesliganden TRAIL war TRAM-34 auch in der Lage die Sensitivität für den Todesliganden CD95L (CH-11) in CH-11-selektierten A-375-CS and Mel-HO-CS signifikant zu verstärken. In Zellen, die eine Resistenz im CD95-Signalweg aufweisen (MeWo, SK-Mel-28) konnte durch die Kombinationsbehandlung mit TRAM/TRAIL keine

Sensitivierung erzielt werden. Es scheint so, dass es verschiedene Signalwege gibt, die zu einer permanenten und einer induzierten Resistenz gegen TRAIL und CD95 führen (Abb. 26A). Die TRAIL-selektierten Zellpopulationen zeigten eine Kreuzresistenz gegen CH-11 (CD95L) und die CH-11-selektierten Zellpopulationen zeigten eine Kreuzresistenz gegen TRAIL, was einen Hinweis auf parallele Signalwege in der induzierten Todesligandenresistenz gibt. TRAM-34 war auch in der Lage diese Kreuzresistenzen zu überwinden (Abb. 26B).

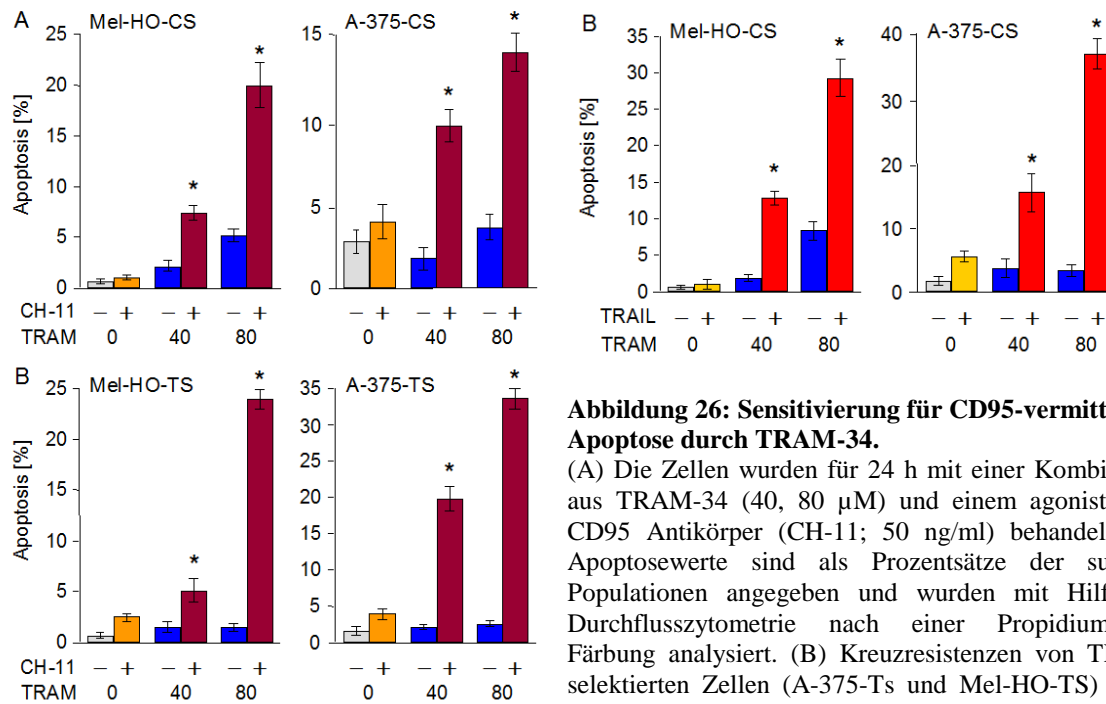


Abbildung 26: Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose durch TRAM-34.

(A) Die Zellen wurden für 24 h mit einer Kombination aus TRAM-34 (40, 80 μM) und einem agonistischen CD95 Antikörper (CH-11; 50 ng/ml) behandelt. Die Apoptosewerte sind als Prozentsätze der sub-G1-Populationen angegeben und wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach einer Propidiumjodid-Färbung analysiert. (B) Kreuzresistenzen von TRAIL-selektierten Zellen (A-375-Ts und Mel-HO-TS) gegen CH-11 und Kreuzresistenzen von CH-11-selektierten

Zellen (A-375-CS und Mel-HO-CS) gegen TRAIL wurden in Kombination mit TRAM-34 untersucht. (A, B) Dargestellt sind sie Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt wurden. Die Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen im Vergleich zu TRAIL-behandelten Zellen.

Um zu zeigen, dass die Blockierung von KCa3.1 zu einer verstärkten Apoptose führt und somit eine Rolle in diesem Prozess spielt, wurde der alternative und weniger selektive KCa3.1-Inhibitor Charybdotoxin (CTX) verwendet. Ähnlich wie TRAM-34 induziert CTX selbst (100-200 nM) nur sehr schwach Apoptose in A-375 und A-375-TS Zellen, ist aber in der Lage die TRAIL-induzierte Apoptose deutlich zu verstärken (Abb. 27A, B). Für den finalen Beweis, dass KCa3.1 in diesem Setting eine bedeutende Rolle spielt, wurden KCa3.1-negative HEK-293-Zellen mit einem KCa3.1-Überexpressionsplasmid transient transfiziert. Kontrolltransfizierte Zellen (Mock) reagierten nicht auf die TRAM/TRAIL Behandlung, die mit dem Überexpressionsplasmid transfizierten Zellen zeigten nach TRAM-34/TRAIL-Behandlung eine deutliche Apoptoseinduktion von 27% (Abb. 27C).

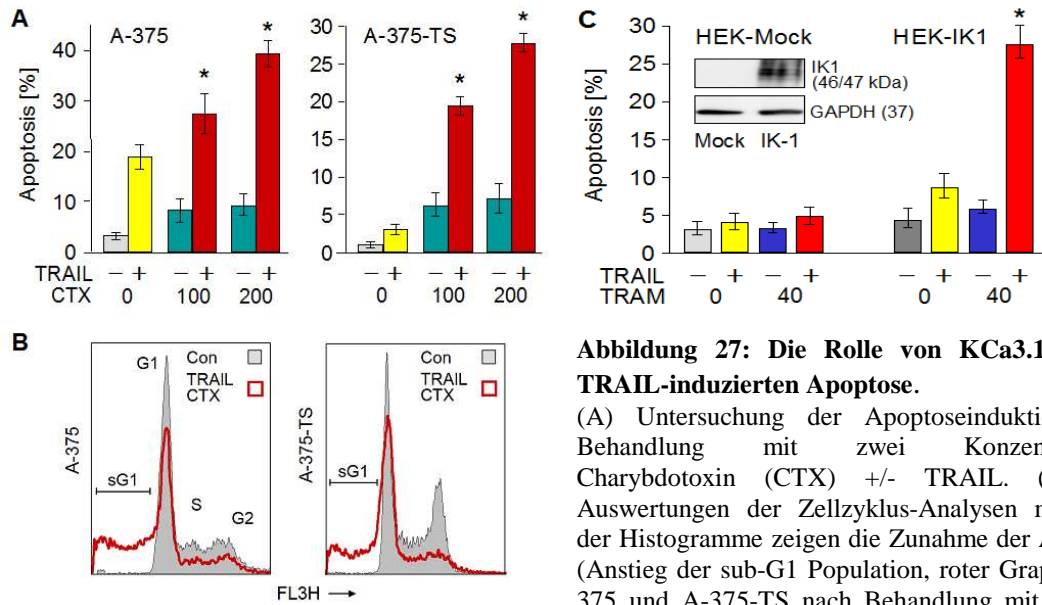


Abbildung 27: Die Rolle von KCa3.1 in der TRAIL-induzierten Apoptose.

(A) Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Behandlung mit zwei Konzentrationen Charybdotoxin (CTX) +/- TRAIL. (B) Die Auswertungen der Zellzyklus-Analysen mit Hilfe der Histogramme zeigen die Zunahme der Apoptose (Anstieg der sub-G1 Population, roter Graph) in A-375 und A-375-TS nach Behandlung mit 200 nM CTX + TRAIL (offener Graph, rot) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen (graue, gefüllte Graphen). (C) HEK-293-Zellen wurden transient mit einem Kontroll- und einem KCa3.1-Überexpressionsplasmid transfiziert und Apoptoseinduktion wurde nach TRAM-34 +/-TRAIL-Behandlung gemessen. Die Proteinexpression von KCa3.1 (IK1) wurde 24 h nach Transfektion mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, jeweils mit Triplikaten, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM /TRAIL-behandelte Zellen im Vergleich zu TRAIL-behandelten Zellen.

Involvierung von Ca^{2+} in der TRAM-verstärkten TRAIL-induzierten Apoptose

Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle weisen eine starke Verbindung zu Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen auf. Auf der einen Seite wird intrazelluläres Ca^{2+} benötigt, um den KCa3.1-Kanal zu öffnen, auf der anderen Seite sorgt der Ausstrom von Kaliumionen zu einer Hyperpolarisierung des Membranpotentials und erhöht so die Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran. Die Effekte der TRAM-34 Behandlung (80 μ M) auf Veränderungen der Ca^{2+} -Level wurden in einer Zeitkinetik (1-8 h) in A-375 Zellen untersucht. Die Messung der Ca^{2+} -Level erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nach der Färbung der Zellen mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Fura-2. Die Behandlung mit TRAM-34 führte zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Level nach 4 und 8 h, was auf eine Dysregulation der Ca^{2+} -Signalwege hindeutet (Abb. 28A).

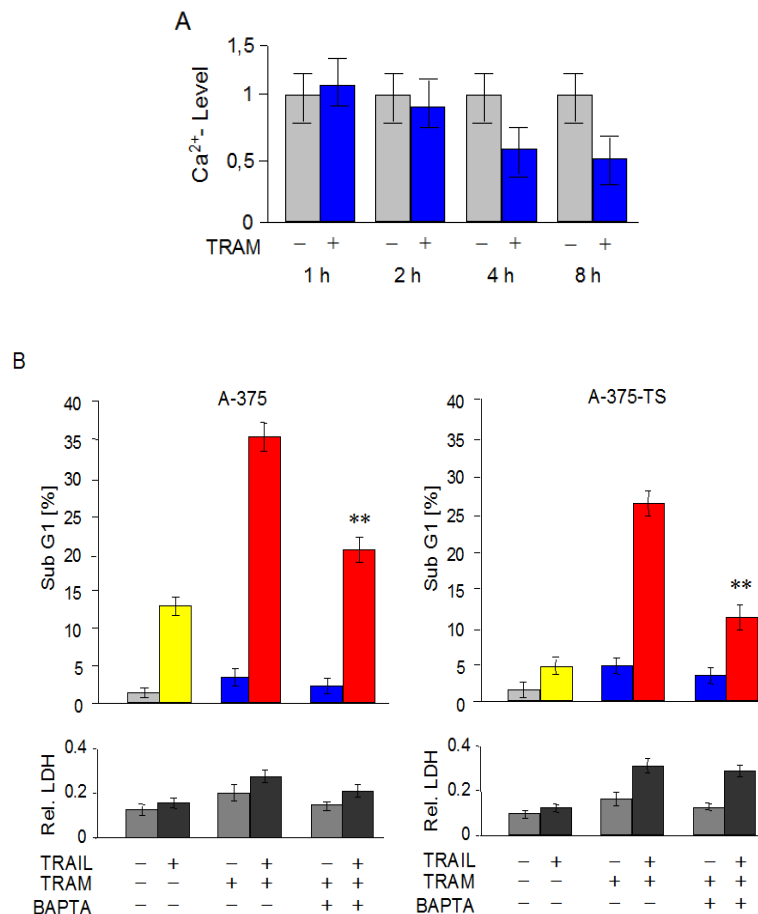


Abbildung 28: Die Rolle von Ca²⁺ in der TRAM-vermittelten Apoptose.

(A) Mit TRAM-34 (80 μ M) und DMSO-behandelte A-375-Zellen wurden mit dem Ca²⁺-Farbstoff Fura-2-AM geladen und das Verhältnis der Fluoreszenz-Emission (510 nm) als Antwort auf eine Anregung mit 340/380 nm ist aufgetragen. Dieses Verhältnis ist ein direkter Indikator für die Konzentration von intrazellulärem, freiem Ca²⁺. Gleiche Zellzahlen wurden analysiert. Das Ergebnis ist ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde über Asterisks ermittelt. (B) Die Induktion der Apoptose wurde in A-375 und A-375-TS Zellen untersucht, nachdem die Zellen für 24 h mit TRAM-34 (80 μ M), TRAIL (20 ng/ml) und BAPTA-AM (1 μ M) behandelt wurden. Die Freisetzung von LDH als Indikator für die Zytotoxizität wurde in einem parallelen Experiment ermittelt. Triton X-100 behandelte Zellen dienten als Positivkontrollen. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, jeweils mit Triplikaten, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit ** ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf die dreifach behandelten Zellen im Vergleich zu TRAM/TRAIL-behandelten Zellen.

Die Beteiligung der Ca²⁺-Signalwege in der TRAM-34-vermittelten Sensitivierung wurde in einem weiteren Experiment mit dem Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM in A-375 und A-375-TS Zellen nachgewiesen. Die Behandlung mit 1 μ M BAPTA-AM zeigte keine Veränderungen in den Apoptoseraten von A-375 und A-375-TS. Die Kombination aus TRAM/TRAIL und BAPTA-AM zeigte nach 24 h eine Abnahme der Apoptose um den Faktor 1,6 in A-375 und um den Faktor 2 in A-375-TS (Abb. 28B). Wie die Untersuchung der Ca²⁺-Level deutete auch dieses Experiment auf eine Dysregulation in den Ca²⁺-Signalwegen hin, die eine Rolle bei den TRAM-34-vermittelten Effekten spielt. Die Freisetzung von LDH zur Bestimmung der

Zytotoxizität wurde parallel zu der Apoptosemessung untersucht und zeigte keine signifikanten Veränderungen (Abb. 28B).

Synergismusstudien zu TRAM-34 und TRAIL

Die Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch TRAM-34 konnte in vier verschiedenen Melanomzelllinien als klar synergistisch gezeigt werden. Synergismus-Studien wurden in A-375, A-375-TS, MeWo und Mel-HO-Zellen mit Hilfe von Dosis-Effekt-Analysen durchgeführt. Dabei wurden konstante Konzentrationsverhältnisse zwischen TRAIL (10-40 ng/ml) und TRAM-34 (20-80 μ M) eingehalten und die Effekte der Kombination und der Einzelbehandlungen wurden miteinander verglichen. Auf diese Weise konnten synergistische Effekt für alle drei Kombinationen in A-375 und A-375-TS (CI-Werte <0,4), für die zwei hohen Konzentrationen in Mel-HO und für die höchste Konzentration von 40 ng/ml TRAIL und 80 μ M TRAM-34 in MeWo (CI-Wert = 0,33), gezeigt werden (Abb. 29).

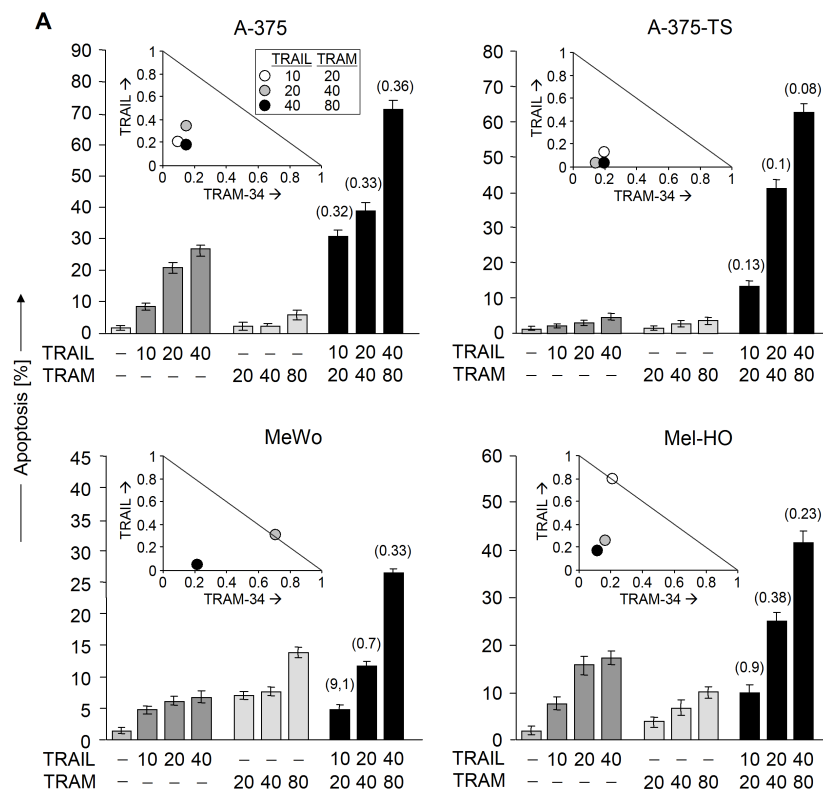


Abbildung 29: Synergismus-Studien zu TRAM-34 und TRAIL.

(A) Die Induktion der Apoptose (Prozentsatz von sub-G1 Zellen) ist für vier Melanomzelllinien nach Behandlung mit TRAM-34 (20-80 μ M) und TRAIL (10-40 ng/ml) gezeigt. Die Substanzen wurden entweder einzeln oder in Kombinationen mit einem konstanten Konzentrationsverhältnis verabreicht. Für die Dosis-Effekt-Analysen wurden relative Konzentrationen von TRAM-34 gegen relative Konzentrationen von TRAIL aufgetragen, wie in den normalisierten Isoblogrammen (Einschübe) zu sehen ist. Die Hypotenuse der Isoblogramme stellt die Linie des additiven Effekts dar, Werte die unterhalb dieser Linie liegen gelten als synergistisch. Drei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Effekte von TRAM-34 auf die TRAIL-Rezeptoren

Die Familie der TRAIL-spezifischen Todesrezeptoren umfasst die zwei agonistischen Todesrezeptoren TRAIL-Rezeptor 1 (TRAIL-R1/DR4) und TRAIL-Rezeptor 2 (TRAIL-R2/DR5) sowie die Köderrezeptoren TRAIL-R3/DcR1 und TRAIL-R4/DcR2. Die Expression der agonistischen Rezeptoren DR4 und DR5 ist elementar für die TRAIL-Sensitivität. Charakteristisch für die A-375-TS Zellen ist eine verminderte Oberflächenexpression von DR4 und DR5 im Vergleich zu den parentalen A-375 Zellen (Kurbanov et al., 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass die Monobehandlung mit TRAIL bereits nach 8 h zu einer starken Verminderung der Oberflächenexpression von beiden Todesrezeptoren führt. Diese negative Resonanzschleife hilft, die schnelle Entwicklung von TRAIL-Resistenzen in Melanomzellen zu verstehen. Nach Behandlung mit TRAM-34 konnte eine signifikante Zunahme der Todesrezeptoren DR4 und DR5 nachgewiesen werden. Für DR5, der grundsätzlich von allen Melanomzelllinien exprimiert wird, konnte eine Zunahme auf der Ebene der Gesamtproteine (Western Blot) und der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie) gezeigt werden (Abb. 30A-B). Vergleichbare Ergebnisse wurden für DR4, in A-375 und A-375-TS, erzielt (Abb. 30C-D). In Zellen, die keine DR4 Expression zeigten (wie z.B. Mel-HO und MeWo) konnte nach TRAM-34 Behandlung keine Zunahme der DR4 Expression gezeigt werden.

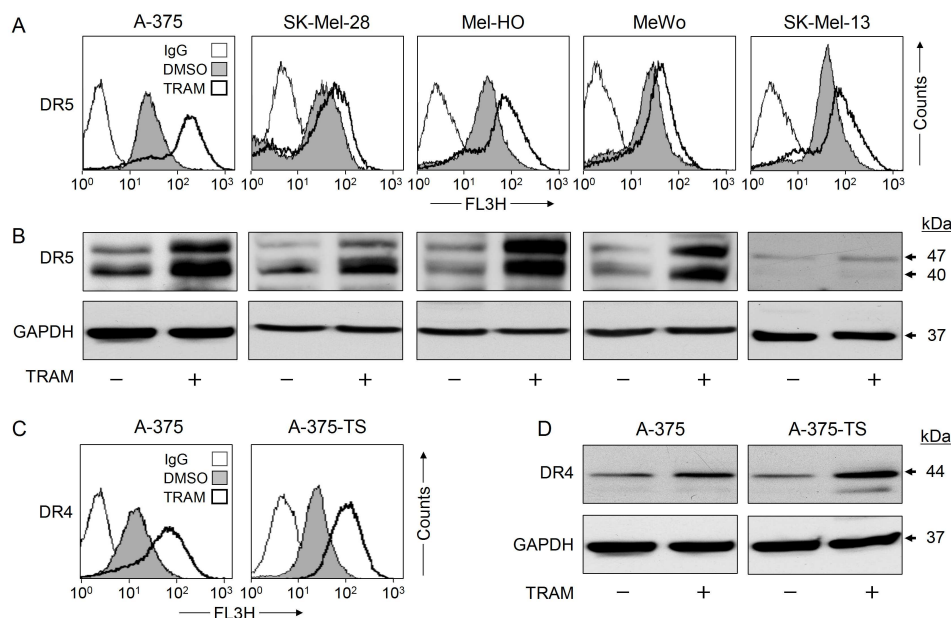


Abbildung 30: Effekte von TRAM-34 auf die TRAIL-Rezeptoren.

(A, B) Die Expression von DR5 ist in fünf Melanomzelllinien (C, D) und die Expression von DR4 ist in A-375 und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit 40 μ M TRAM-34 gezeigt. Als Kontrolle dienten die DMSO-behandelten Zellen. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse, die Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. (A, C) Drei unabhängige Experimente, die jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Für die Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 konnte, im Gegensatz zu den Positivkontrollen HeLa und SW480, generell keine basale Oberflächenexpression in A-375, SK-Mel-28, Mel-HO und SK-Mel-13 gezeigt werden. Nur in MeWo konnte eine geringe Basalexpression von DcR2 nachgewiesen werden. Die Behandlung mit TRAM-34 blieb jedoch ohne Effekt auf die Köderrezeptorexpression in Melanomzellen (Abb. 31A). Um die spezifische Beteiligung der agonistischen Todesrezeptoren DR4 und DR5 auf die TRAM-34/TRAIL-induzierte Apoptose gezielt zu untersuchen, wurden selektive antagonistische Antikörper verwendet. In den DR4-positiven Zellen (z.B. A-375) wurde die Apoptose vorzugsweise von dem DR4-Antagonisten blockiert (von 38% auf 12%), in den DR4-negativen Zellen (z.B. Mel-HO) wurde die Apoptose um 70% durch den DR5-Antagonisten vermindert (Abb. 31B). Diese Experimente haben deutlich gezeigt, dass TRAM-34 die TRAIL-induzierte Apoptose über den Signalweg der Todesrezeptoren verstärkt.

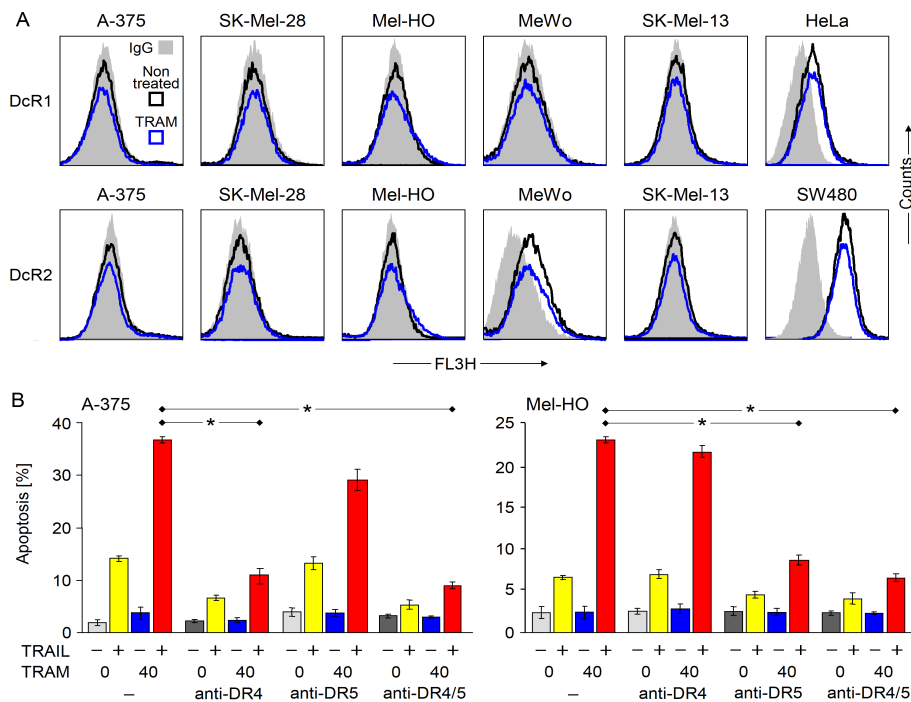


Abbildung 31: Der Effekt von TRAM-34 auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren.

(A) Expression von DcR1 und DcR2 wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Behandlung mit TRAM-34 in fünf verschiedenen Melanomzelllinien bestimmt. HeLa und SW480-Zellen dienen als Positivkontrollen für DcR1 und DcR2. IgG1-gefärbte Zellen dienen als Negativkontrollen. Zwei unabhängige Experimente, jeweils mit Dreifachwerten, zeigten in hohem Maße vergleichbare Ergebnisse. (B) Nach Behandlung mit TRAM +/- TRAIL und der Blockierung von DR4 und/oder DR5 mit antagonistischen Antikörpern wurde die Apoptose in A-375 und Mel-HO bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils mit Triplikaten durchgeführt wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen im Vergleich zu TRAIL-behandelten Zellen.

Aktivierung der Caspasen

Um zu entschlüsseln, auf welche Art und Weise TRAM-34 in der Lage ist Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose zu sensibilisieren, wurde die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -9 und der Effektorcaspase-3 mittels Westernblot-Analyse untersucht. In den sensitiven A-375 Zellen führt die Behandlung mit TRAIL alleine zu einer signifikanten Aktivierung der Caspasenkaskade, zu sehen 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). Erstaunlicherweise wurde die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 durch die Kombinationsbehandlung nicht wie erwartet weiter verstärkt, die Caspase-9 jedoch schon (Abb. 32A). In den TRAIL-selektierten A-375-TS führte die Behandlung mit TRAIL ebenfalls zu einer deutlichen Aktivierung der Caspase-8, aber nur zu einer unvollständigen Aktivierung der Caspase-3, zu sehen an dem 20 kDa Spaltprodukt. Wie für die parentalen Zellen zeigten die A-375-TS ebenso keine verstärkte Aktivierung der Caspase-8 nach Kombinationsbehandlung, die Caspasen-9 und -3 waren jedoch verstärkt aktiviert. Die komplette Prozessierung und damit vollständige Aktivierung der Caspase-3 wurde überdies von der Spaltung des Todessubstrates PARP begleitet (Abb. 32A).

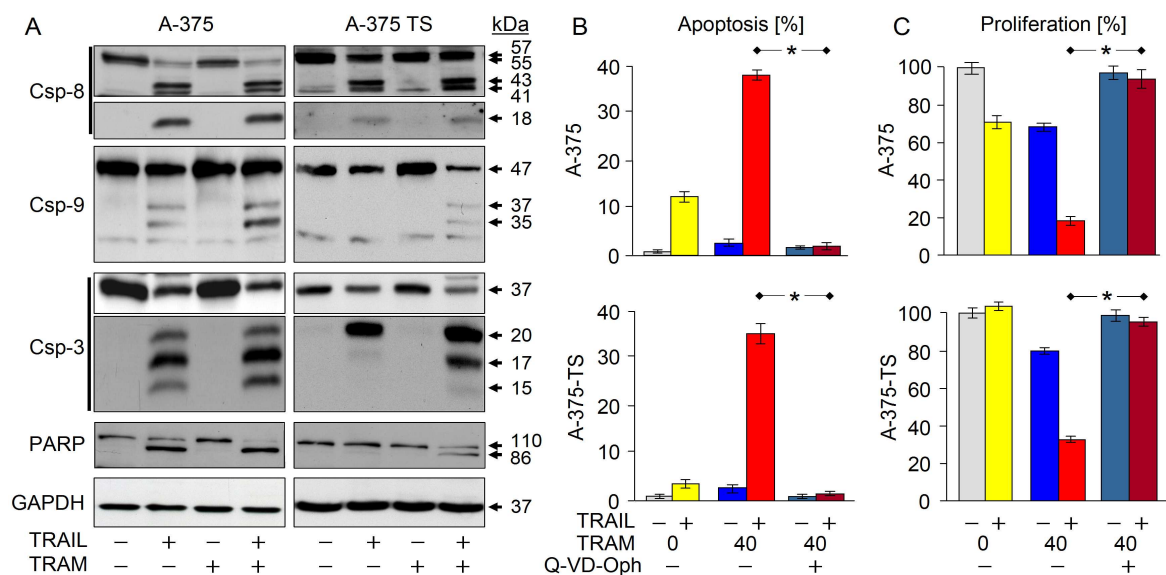
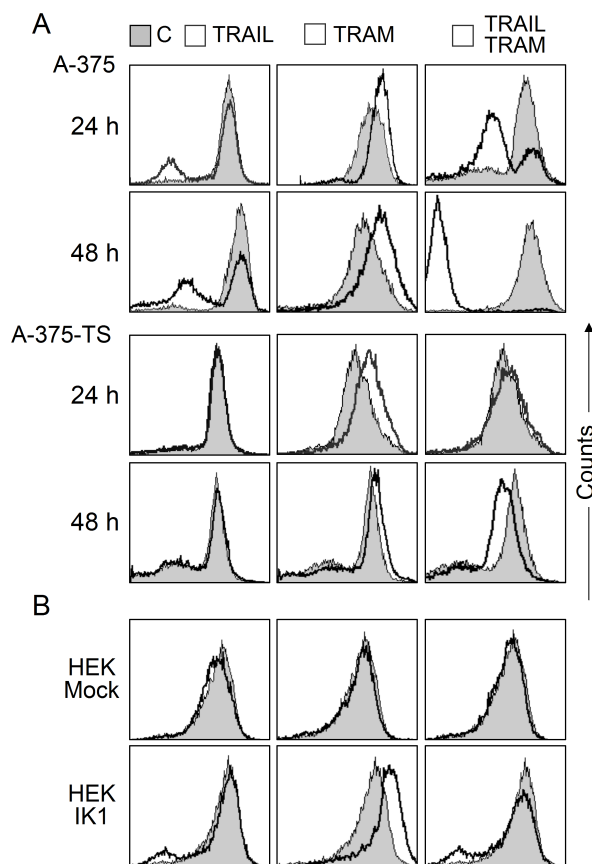


Abbildung 32: Caspasen-Aktivierung nach Behandlung mit TRAM-34 und TRAIL.

(A) Die Prozessierung der Caspasen-8, -9 und -3 wurde in A-375 und A-375-TS Zellen nach Behandlung mit TRAM-34 (40 μ M) und TRAIL mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. (B) Dargestellt ist die Induktion der Apoptose (prozentualer Anteil der sub-G1 Zellen) in A-375 und A-375-TS. Die Zellen wurden für 1 h mit dem Pan-Caspaseinhibitor Q-VD-Oph (10 μ M) vorinkubiert und anschließend mit TRAM-34 +/- TRAIL behandelt. (C) Die Zellproliferation wurde parallel zur Apoptose mit Hilfe des WST-1 Assays bestimmt. (B, C) Mittelwerte \pm SDs von zwei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte der blockierten Apoptose und der wieder hergestellten Zellproliferation durch Q-VD-Oph sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet.

Um die besondere Rolle der Caspasen in der TRAM-34/TRAIL-induzierten Apoptose zu unterstreichen, wurde der Pancaspaseinhibitor Q-VD-OPh eingesetzt, der irreversibel an die katalytische Domäne der Caspasen bindet. Die Vorbehandlung der Zellen für 1 h mit 10 μM Q-VD-OPh blockierte nahezu vollständig die TRAM-34/TRAIL-induzierte Apoptose und verbesserte das Zellüberleben erheblich (Abb. 32B-C).

Aktivierung des mitochondrialen Signalweges



Die Beteiligung des mitochondrialen Apoptose-signalweges wurde mit Hilfe eines mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\psi\text{m}$)-abhängigen Farbstoffes untersucht. Interessanterweise zeigten A-375 Zellen nach Behandlung mit TRAIL einen Verlust von $\Delta\psi\text{m}$ nach 24 h (22%) mit steigender Tendenz nach 48 h (40%). Die Kombination von TRAM-34 und TRAIL führte zu einem massiven Verlust des $\Delta\psi\text{m}$ von 56% nach 24 h und sogar 90% nach 48 h. Interessanterweise führte TRAM-34 Monobehandlung nicht zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sondern zu einer Hyperpolarisation sowohl in A-375 und A-375-TS Zellen zu 4, 24 und 48 h (Abb. 33A).

Abbildung 33: Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs.

(A, B) Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi\text{m}$) in A-375, A-375-TS (A) und Mock- und KCa3.1 (IK1)-transfizierten HEK-293-Zellen 24 h und 48 h nach Behandlung mit 40 μM TRAM-34 +/- TRAIL. Behandelte Zellen (offene Graphen) wurden mit DMSO-behandelten Zellen (graue, geschlossene Graphen) verglichen. Drei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse sprechen für einen direkten Effekt von TRAM-34 auf die Mitochondrien. In den TRAIL-selektierten Zellen konnte nach TRAIL-Behandlung kein Verlust von $\Delta\psi\text{m}$ detektiert werden. Unter Kombinationsbedingungen hat sich die durch TRAM-34 hervorgerufene Hyperpolarisation nach 24 h auf den Kontrollpeak zurück verschoben, nach 48 h war sogar eine klare Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials zu sehen. Um zu

klären welche Bedeutung bzw. welchen Anteil Kaliumkanäle am mitochondrialen Membranpotential haben, wurden HEK-293 Zellen mit einem Mock-Plasmid oder dem KCa3.1-Plasmid transient transfiziert. Während die Mock-transfizierten Zellen nach TRAM-34 Behandlung keine Zunahme (Hyperpolarisation) des mitochondrialen Membranpotentials zeigten, konnte dieser Effekt deutlich in den KCa3.1-transfizierten HEK-293 Zellen nachgewiesen werden. Unter Einfluss von TRAM-34 und TRAIL nahm die Hyperpolarisation ab und verschob sich auf die basalen Level zurück (Abb. 33B). Damit konnte ein deutlicher Beweis erbracht werden, dass die TRAM-34-vermittelte Zunahme des $\Delta\psi_m$ eindeutig von KCa3.1 abhängig ist.

Abhängigkeit der TRAM-34-vermittelten Sensitivierung von Bcl-2 Proteinen

Obwohl die Expressionsmuster der pro- und antiapoptotischen Proteine keinerlei Modulation aufwiesen (Abb. 34), konnte eine klare Abhängigkeit von Bax und Bcl-2 aufgezeigt werden.

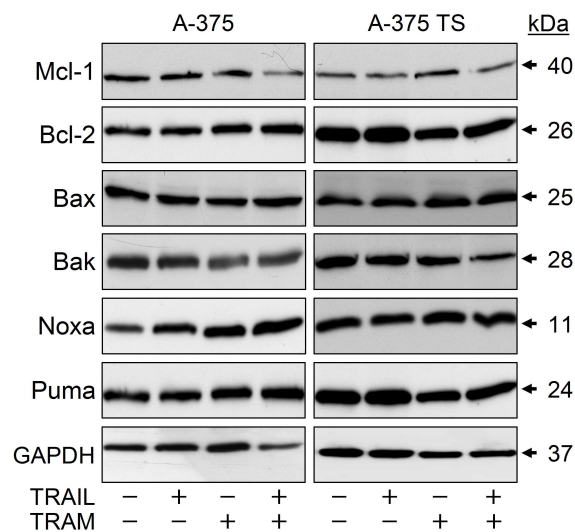


Abbildung 34: Expression der Bcl-2 Proteine in Abhängigkeit von TRAM/TRAIL.

Die Expression der Bcl-2 Proteine wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse in A-375 und A-375-TS untersucht. Weder die Behandlung mit 20 ng/ml TRAIL, 40 μ M TRAM-34 oder der Kombinationen führte zu einer veränderten Expression der Bcl-2 Proteine. Zwei voneinander unabhängige Experimente wurden durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die entscheidende Rolle des mitochondrialen Signalwegs wurde durch weitere Experimente zur Bax- und Bcl-2-Abhängigkeit untermauert. Um die Bax-Abhängigkeit der TRAM-34/TRAIL-induzierten Apoptose im Zusammenhang mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg untersuchen zu können, wurden HCT-116 Kolonkarzinomzellen (Bax^+/Bak^+) und Subzelllinien mit einem Bax-Knockout (Bax^-/Bak^+), einem Bak-Knockdown (Bax^+/Bak^-) oder einem Doppelknockdown

(Bax⁻/Bak⁻) eingesetzt (Abb. 35; eingefügte Abbildung). Die Kombination aus TRAM-34 und TRAIL zeigte in den HCT-116 Wildtypzellen eine starke Apoptoseinduktion von 50%, die vergleichbar stark auch in den Bak-defizienten Zellen zu sehen war. Während der Einzelknockout für Bax zu einer deutlichen Reduktion der Apoptose führte, konnten die doppelt-defizienten Zellen die Apoptoseinduktion durch TRAM-34/TRAIL vollständig blockieren (Abb. 35).

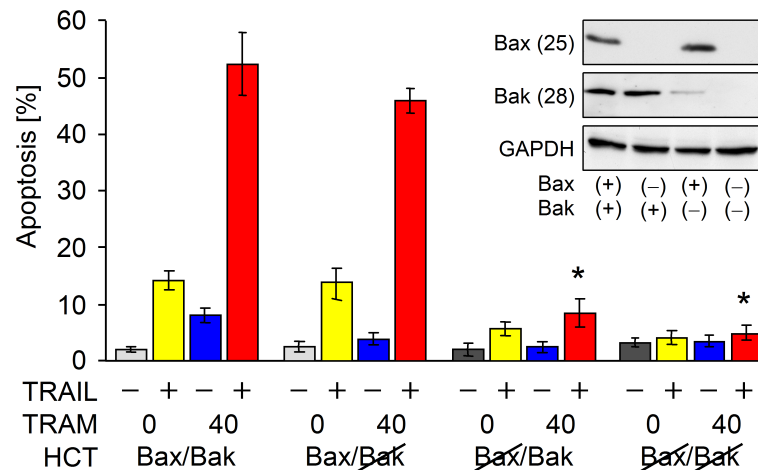


Abbildung 35: Abhängigkeit der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose von Bax.

Die durch die Kombination von TRAM-34 und TRAIL induzierte Apoptose wurde in parentalen HCT-116 (Bax⁺, Bak⁺)-Zellen und in den Subklonen mit einem Knockdown für Bax und/oder Bak mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Der Knockdown von Bax und Bak wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft. Zwei voneinander unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse und statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen des Bax Knockdown und des doppelten Knockdowns im Vergleich zu den TRAM/TRAIL-behandelten Zellen im Wildtyp.

Parallel zu den Bax-Experimenten, wurden mit einem Bcl-2-Expressionsplasmid stabil transfizierte A-375 Zellen (A-375-Bcl-2) eingesetzt, um die Rolle von Bcl-2 in der TRAM-34/TRAIL vermittelten Apoptose zu untersuchen. Derweil in den Mock-transfizierten Zellen (A-375-Mock) über 40% apoptotische Zellen nach TRAM/TRAIL Behandlung zu detektieren waren, waren die Bcl-2-transfizierten Zellen komplett gegen den proapoptischen Effekt der Kombinationsbehandlung geschützt (Abb. 36A). Ebenso wie die Apoptose, konnten auch die durch TRAM-34 verursachte Hyperpolarisation und der Verlust des $\Delta\psi_m$ durch die Kombinationsbehandlung vollständig durch die Bcl-2 Überexpression blockiert werden (Abb. 36B).

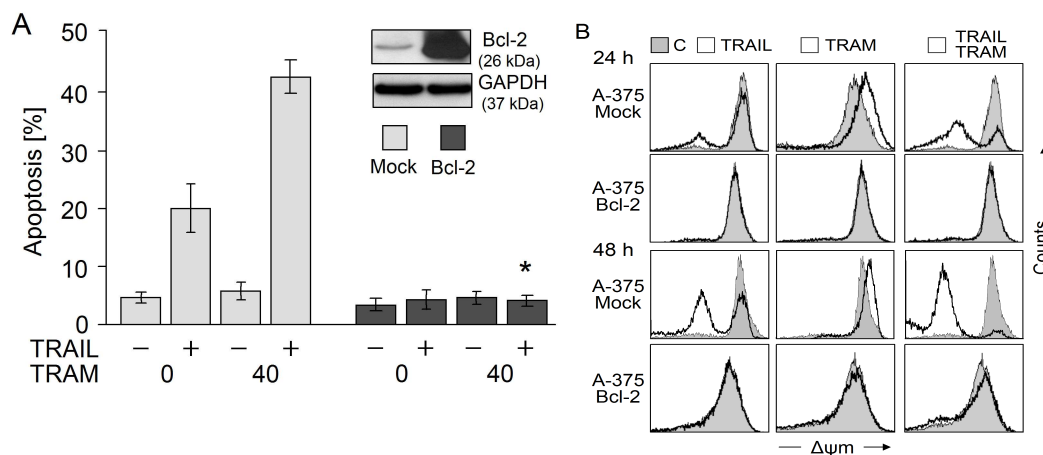


Abbildung 36: Überexpression von Bcl-2 blockiert die TRAM/TRAIL-induzierte Apoptose.

(A) Apoptoseinduktion nach TRAM/TRAIL-Behandlung wurde in A-375 Zellen stabil mit Bcl-2 transfiziert (A-375-Bcl-2) und in Kontroll-transfizierten Zellen (A-375-Mock) untersucht. Die Überexpression von Bcl-2 wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse nachgewiesen. (B) Dargestellt ist die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) 24 h und 48 h nach TRAM-34 +/- TRAIL in Kontroll-transfizierten und Bcl-2-transfizierten A-375-Zellen. Die Messung wurde im Durchflusszytometer durchgeführt.

Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren

Die direkten Effekte von TRAM-34 auf die Mitochondrien könnten mit dem Auftreten von KCa3.1(IK1)-Kaliumkanälen in der mitochondrialen Membran erklärt werden. In der Tat konnte eine signifikante KCa3.1-Expression in den mitochondrialen Extrakten nachgewiesen werden, die sich auch durch verschiedene Behandlungen nicht verändern liess (Abb. 37A). Im Zusammenhang mit der gezeigten Bax-Abhängigkeit wurde eine mitochondriale Translokation von Bax untersucht. Sowohl in A-375 als auch A-375-TS Zellen konnte nach TRAM-34 Monobehandlung und nach Kombinationsbehandlung eine Bax-Translokation an die Mitochondrien schon nach 4 h gezeigt werden. Da zu 4 h noch keinerlei Apoptose nachzuweisen war, deutete diese Translokation auf einen initialen Schritt in der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose hin (Abb. 37B). Von besonderem Interesse, im Zusammenhang mit der Aktivierung des intrinsischen Signalweges, war die starke Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren wie Cytochrom C, AIF und SMAC. Ähnlich wie die Translokation, konnte auch die Freisetzung von Cytochrom C, AIF und SMAC schon zu 4 h nach Kombinationsbehandlung gezeigt werden (Abb. 37C). Eine vergleichbare Intensität der Westernblot Analyse konnte nach 24 h für A-375, A-375-TS und A-375-Mock Zellen gezeigt werden, wohingegen die Bcl-2-Überexpression die Freisetzung von Cytochrom C, AIF und SMAC vollständig blockiert hat (Abb. 37C).

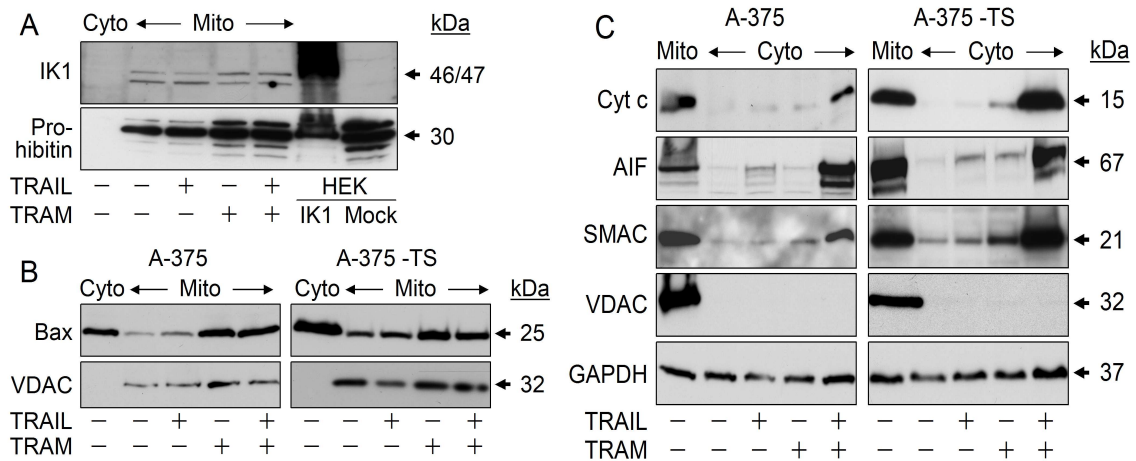


Abbildung 37: Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien.

(A) Mitochondriale Extrakte von A-375 wurden auf die Expression von KCa3.1 (IK1) mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Behandelt wurden die Lysate mit 40 μ M TRAM +/- 20 ng/ml TRAIL für 24 h. Vergleichbare Mengen der mitochondrialen Extrakte (10 μ l) wurden aufgetragen und mittels Prohibitin überprüft. Ein zytosolischer Extrakt (Cyto) und Gesamtlisate von Kontroll- und KCa3.1-transfizierten HEK-293-Zellen dienten als Kontrolle. (B, C) Mitochondriale (Mito) und zytosolische Extrakte (Cyto) von A-375 und A-375-TS wurden für 4 h mit 40 μ M TRAM-34 +/- TRAIL behandelt und mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Gleichmäßige Beladung wurde mittels des mitochondrialen Proteins VDAC und des zytosolischen Proteins GAPDH untersucht. Die Inkubation der zytosolischen Extrakte mit VDAC sollte die Kontamination mit mitochondrialen Proteinen ausschließen.

Eine weiterführende Bestätigung des Vorhandenseins von KCa3.1-Kanälen in der mitochondrialen Membran sollte mit Hilfe von Immunpräzipitationsanalysen untersucht werden. Hierfür wurde in A-375 und A-375-TS Zellen nach Interaktionen von KCa3.1 und Bax gesucht. A-375 und A-375-TS Zellen wurden transient mit einem Myc-getaggten Bax-Expressionsplasmid transfiziert. Die daraufhin überexprimierten Myc-getaggten Proteine wurden anschließend mittels anti-Myc-Microbeads immunpräzipitiert. Die Überexpression von Bax wurde in der (S)-Fraktion (engl.: supernatant) demonstriert und die effiziente Immunpräzipitation mittels Bax-spezifischem Antikörper mit der Pelletfraktion (P) kontrolliert (Abb. 38). Leider konnte dabei keine eindeutige Interaktion zwischen Bax und KCa3.1 festgestellt werden, wie an den schwachen Banden der Pelletfraktionen (P) zu sehen war (rote Kästchen). Erstaunlicherweise konnte aber eine leichte Abnahme von Bcl-2 nach TRAM-34 Behandlung gezeigt werden. Möglicherweise könnte TRAM-34 die Bindung von Bcl-2 und Bax, in einer noch ungeklärten Art und Weise, beeinflussen. Als Kontrolle für die Funktionalität des Versuches sowie die Interaktionen der Bcl-2-Proteine konnte die bereits bekannte Bindung von Myc-getaggtem Bax an Bcl-2 und endogenem Bax gezeigt werden (Abb. 38).

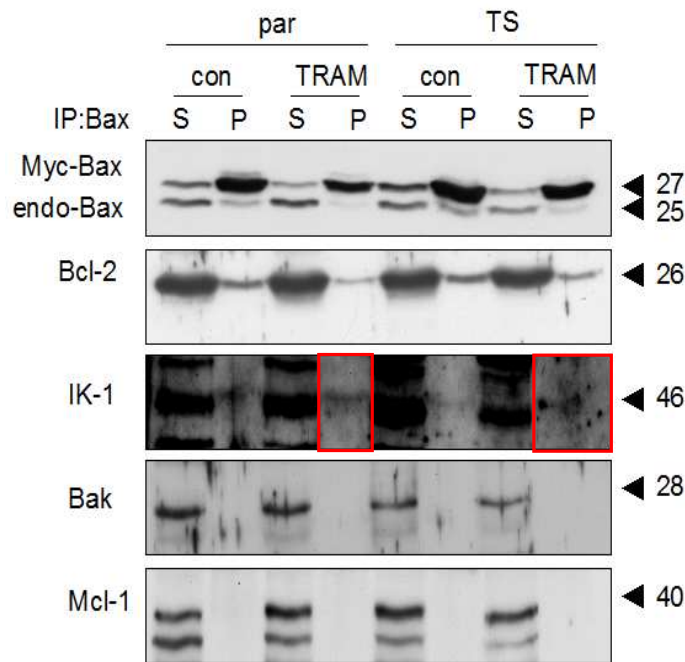


Abbildung 38: Nachweis der Bindung von KCa3.1 an Bax.

A-375 und A-375-TS Zellen wurden mit Myc-getagtem Bax transient transfiziert. Das überexprimierte Myc-getaggte Bax wurde mit Hilfe der anti-myc-Mikroperlen immunpräzipitiert und die Immunpräzipitation mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Die Mock-Kontrollen wurden mit einem pcDNA3-Plasmid transfiziert. Myc-getaggte Proteine laufen mit einem höheren Molekulargewicht, als die endogen exprimierten Proteine. Der Überstand, der nicht an die Säule bindet (S = Supernatant), wurde mit der immunpräzipitierten Pelletfraktion (P) verglichen. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, lieferte aber keine eindeutigeren Ergebnisse.

Verbindung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges über Bid

Es ist bekannt, dass der extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg durch das proapoptotische Bcl-2 Protein Bid miteinander verbunden sind. Bid wird durch Caspase-8 gespalten (zu tBid, engl.: **truncated Bid**) und damit aktiviert. Im Folgenden wurde die Rolle von Bid in der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose untersucht. Die Behandlung von A-375 und A-375-TS Zellen mit anti-Bid siRNS zeigte eine deutlich verminderte Apoptoseinduktion (etwa 15%) nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen (Mock; um die 35%) (Abb. 39).

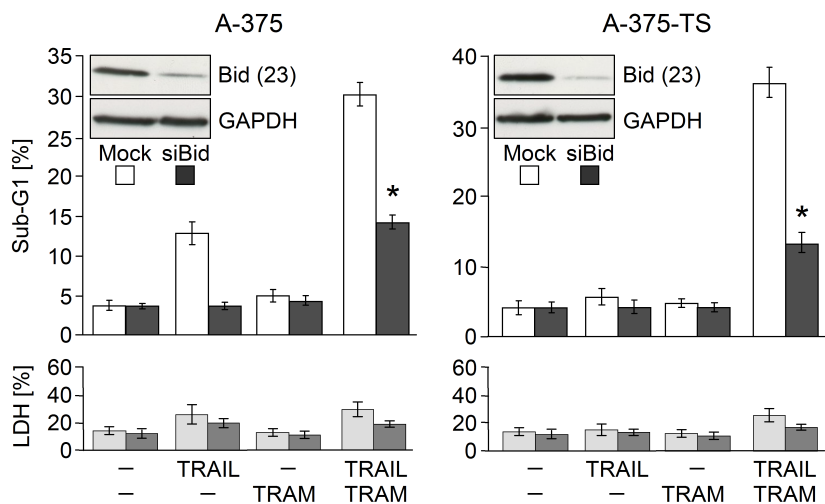


Abbildung 39: Direkte Verbindung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges über Bid. Die Sensitivität von A-375 und A-375-TS Zellen für die TRAM/TRAIL-induzierte Apoptose ist hier nach dem siRNS-vermittelten Bid Knockdown gezeigt. Die entsprechenden Kontrollen (Mock; Kontroll-siRNS) sind zum Vergleich gezeigt. Die Apoptose (Prozentsatz von sub-G1-Zellen) und die Zytotoxizität (Freisetzung von LDH in Prozent) wurden 24 h nach Behandlung gemessen. Zwei unabhängige Experimente, jeweils mit Dreifachwerten gemacht, zeigten vergleichbare Ergebnisse. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen nach Bid Knockdown im Vergleich zu den Kontroll-siRNS transfizierten Zellen. Die Herunterregulation von Bid durch siRNS wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht.

Die maßgebliche Rolle des SMAC-IAP Gleichgewichtes

Wie die Untersuchung der Caspasen in Abbildung 32 gezeigt hat, scheint die nicht vollständige Prozessierung der Caspase-3 ein limitierender Schritt in der TRAIL-induzierten Apoptose zu sein. Dies gab Anlaß zu der Vermutung, dass die zytosolischen IAPs (cIAP, engl.: cytosolic inhibitor of apoptosis proteins), die Inhibitoren der Apoptose, eine zentrale Rolle spielen. Eine Reihe von Melanomzelllinien zeigte eine signifikante Expression von verschiedenen zytosolischen IAPs wie Survivin, XIAP und cIAP2 wie auch des cIAP Antagonisten SMAC (Abb. 40A). Um die Rolle von XIAP in der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden A-375 und A-375-TS Zellen transient mit einem XIAP-Überexpressionsplasmid transfiziert. Die Überexpression von XIAP führte zu einer 60- bis 70 prozentigen Abnahme der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen. Dies kennzeichnete XIAP als potenten Inhibitor der TRAM-vermittelten TRAIL-induzierten Apoptose (Abb. 40B).

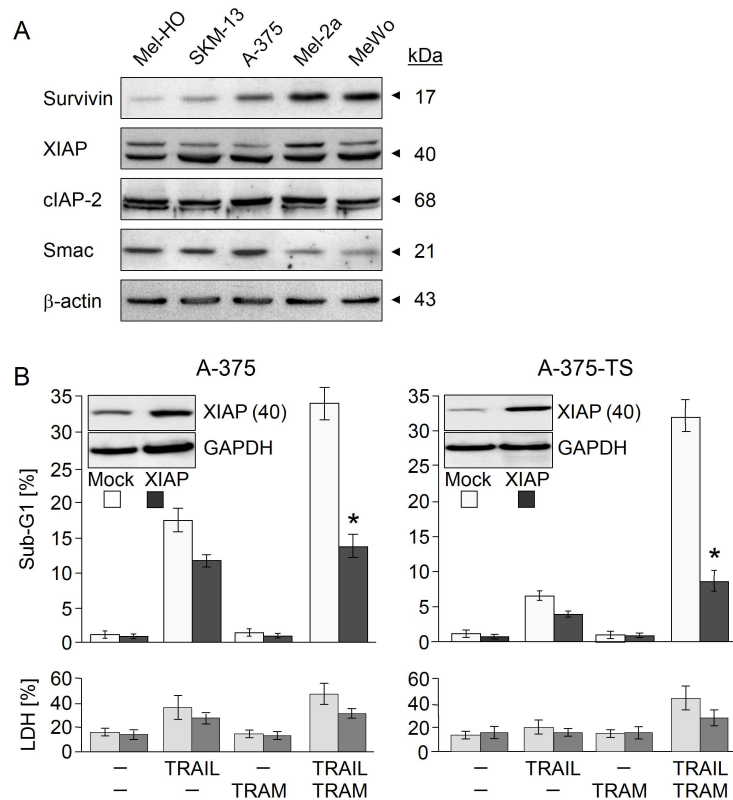


Abbildung 40: Bedeutung der IAPs für die verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose durch TRAM-34.

(A) Proteinlysate von fünf Melanomzelllinien wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse auf die Expression verschiedener IAPs (Survivin, XIAP, cIAP-2) und des natürlichen IAP-Antagonisten SMAC untersucht. (B) A-375 und A-375-TS Zellen wurden mit einem XIAP-Überexpressionsplasmid und einem Kontrollplasmid transient transfiziert und die Apoptoseinduktion nach TRAM/TRAIL-Behandlung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Apoptose (Prozentsatz von sub-G1-Zellen) und die Freisetzung von LDH (Zytotoxizitäts-Indikator, angegeben in %) sind nach 24 h Behandlung gezeigt. Die Überexpression von XIAP wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft. Zwei unabhängige Experimente, die jeweils mit Dreifachwerten gemacht wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen nach XIAP Überexpression im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen (Mock).

Da SMAC als wichtiger IAP Inhibitor bekannt ist und auf Grund der starken Freisetzung von SMAC aus den Mitochondrien (in Abb. 37 gezeigt) wurde in einem finalen Experiment eine siRNS gegen SMAC in A-375 und A-375-TS Zellen eingesetzt. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, konnte die anti-SMAC siRNS die A-375-TS-Zellen vollständig vor der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose schützen. Die parentalen A-375 Zellen zeigten nach SMAC Knockdown eine stark beeinträchtigte Apoptose, die sich auf das Niveau der von TRAIL induzierten Apoptose drücken ließ. Dieses Experiment belegte die entscheidende Rolle von SMAC in der Fragestellung der Überwindung von induzierten TRAIL-Resistenzen in Melanomzelllinien. Zytotoxizität spielte in keinem der ausschlaggebenden Experimente eine entscheidende Rolle, wie in Abbildung 41 zu sehen ist.

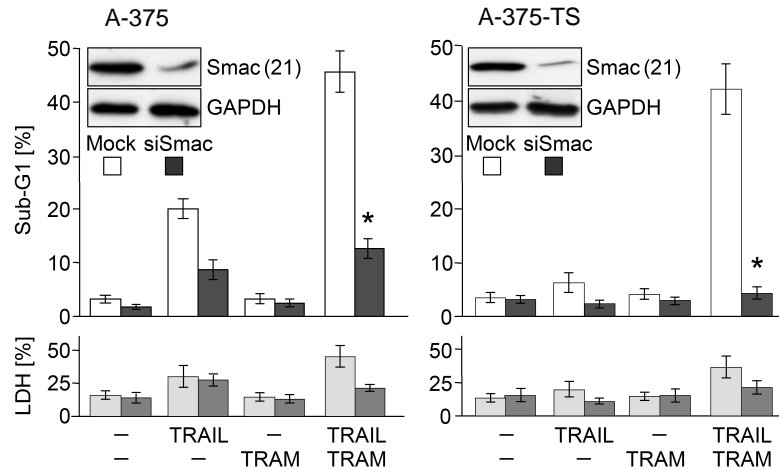


Abbildung 41: Die entscheidende Rolle von SMAC.

In A-375 und A-375-TS Zellen wurde die Rolle von SMAC auf die TRAM-verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose untersucht. Die Zellen wurden mit einer SMAC-siRNS und einer Kontroll-siRNS transient transfiziert und die Apoptoseinduktion nach TRAM/TRAIL-Behandlung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Apoptose (Prozentsatz von sub-G1-Zellen) und die Freisetzung von LDH (Zytotoxizitäts-Indikator, angegeben in %) sind nach 24 h Behandlung gezeigt. Der Knockdown von SMAC wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft. Zwei unabhängige Experimente, jeweils mit Dreifachwerten gemacht, zeigten vergleichbare Ergebnisse. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf TRAM/TRAIL-behandelte Zellen nach SMAC Knockdown im Vergleich zu den Kontroll-siRNS transfizierten Zellen.

Die Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch TRAM-34 beruhte zu einem großen Teil auf der Freisetzung von SMAC. Das Gleichgewicht zwischen freigesetztem SMAC und antiapoptotischen cIAPs scheint ein essenzieller Schritt in der Regulation der TRAIL-Sensitivierung in Melanomzellen zu sein.

Strategie II - Sensitivierung durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin

Wortmannin verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose

Um mögliche weitere Strategien zur Überwindung der TRAIL-Resistenz in Melanomzelllinien zu überprüfen, wurde der PI3K-Inhibitor Wortmannin untersucht. Kombinationen von Wortmannin und TRAIL wurden in TRAIL-sensitiven Melanomzelllinien (A-375, Mel-HO), in Zellen mit einer selektiven TRAIL-Resistenz (A-375-TS, Mel-HO-TS) und in permanent TRAIL-resistenten Zelllinien (MeWo und Mel-2a) untersucht. Die Behandlung mit Wortmannin führte in A-375 und A-375-TS zu einer Abnahme der Phosphorylierung von Akt an Serin-473 und Threonin-308 innerhalb von 15 Minuten. Das Level von Akt hingegen blieb unbeeinflusst. Der Effekt der blockierten Akt-Phosphorylierung erwies sich als reversibel, da nach 4 h wieder eine Phosphorylierung an beiden Phosphostellen zu sehen war (Abb. 42A). Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe der Zellzyklusanalyse untersucht (sub-G1-Zellen; Zellen mit fragmentierter DNS; Abb. 42B). Die Einzelbehandlung mit Wortmannin führt nicht zu einer Apoptoseinduktion nach 24 h und die Monobehandlung mit TRAIL zeigte nur eine moderate Apoptoseinduktion von 4 bis 10% in Mel-HO und A-375. Nach Behandlung mit der Kombination aus Wortmannin und TRAIL konnte eine deutliche Verstärkung der Apoptose nachgewiesen werden. Die sensitiven Zelllinien (Mel-HO, A-375) reagierten mit einer Apoptoseinduktion von 18-28%, die TRAIL-selektierten Zellen (Mel-HO-TS, A-375-TS) mit einer Apoptoseinduktion von 12-20% (Abb. 42B). Nur die permanent resistenten Zelllinien MeWo und Mel-2a konnten nicht durch Wortmannin für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden. Zu diesem Zeitpunkt (24 h) spielte die Zytotoxizität (Messung des freigesetzten LDH), wie in Abbildung 42B gezeigt, keine Rolle. Die Induktion der Apoptose führte zu einem signifikanten Verlust der Zellproliferation. In Echtzeit-Zellanalysen mit dem xCELLigence System der Firma Roche konnte in A-375 und A-375-TS Zellen nach der Behandlung mit 4 μ M Wortmannin und 20 ng/ml TRAIL ein deutlicher Verlust der Zellproliferation (rote Kurven) aufgezeigt werden (Abb. 42C).

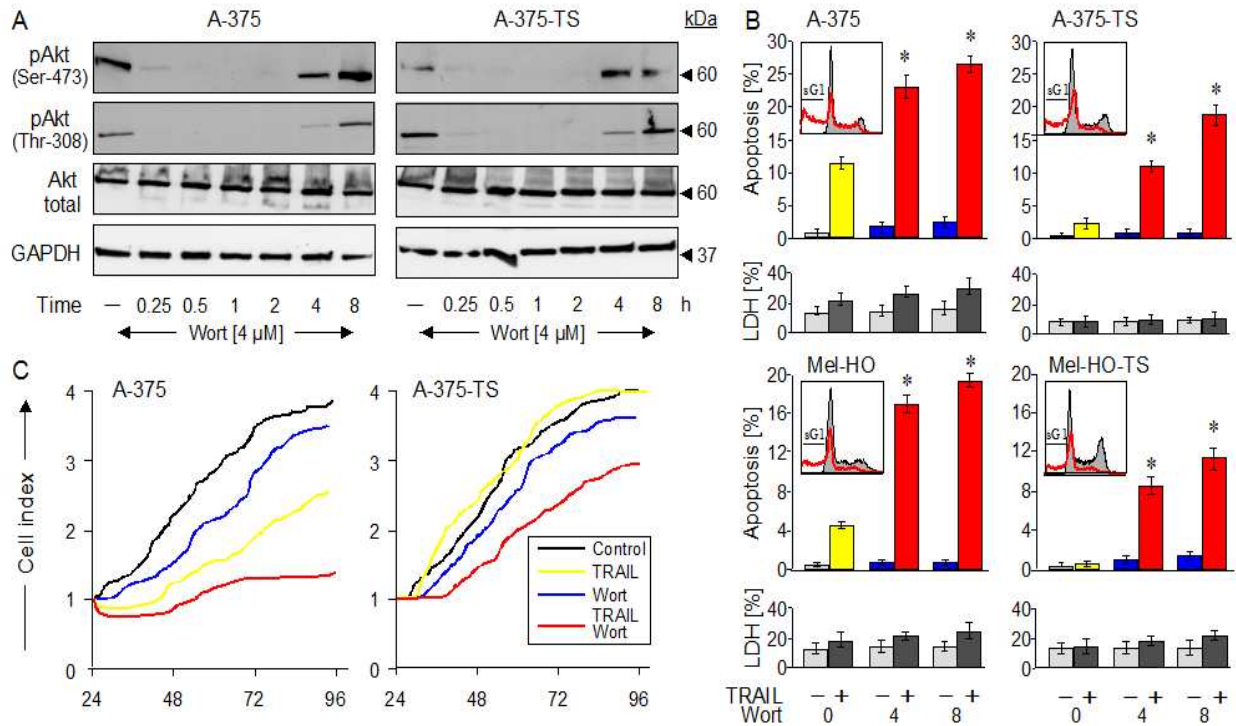


Abbildung 42: Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mit Wortmannin.

(A) Zeitabhängige Veränderungen der Phosphorylierung von Akt an den Phosphorylierungsstellen Serin-473 und Threonin-308 nach Behandlung mit 4 μM Wortmannin. Die Phosphorylierung wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse in A-375 und A-375-TS Zellen untersucht. Expression von Akt total diente als Kontrolle. Eine gleichmäßige Beladung der SDS-Gele mit 30 μg Protein wurde mittels GAPDH überprüft. (B) In Zellzyklusanalysen wurde die Apoptoseinduktion (Prozentsatz von sub-G1-Zellen) in vier Melanomzelllinien (A-375, A-375-TS, Mel-HO, Mel-HO-TS) nach Behandlung mit Wortmannin (4, 8 μM) +/- TRAIL untersucht. Parallel dazu wurde die Zytotoxizität mit einem Assay zur Bestimmung der freigesetzten LDH-Menge bestimmt. Mittelwerte \pm SDs von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf den Vergleich von Wortmannin/TRAIL behandelten Zellen zu TRAIL-behandelten Zellen. Die Einschübe in den Diagrammen zeigen Histogramm-Beispiele für Zellen, die mit Wortmannin +/- TRAIL (offene Graphen, rot) behandelt wurden im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen). Sub-G1 Populations sind mit sG1 gekennzeichnet. (C) Echtzeit-Zellanalyse von A-375 und A-375-TS Zellen behandelt mit Wortmannin +/- TRAIL. Als Kontrolle wurden DMSO-behandelte Zellen verwendet (schwarze Linie). Die Zellindizes wurden auf den Zeitpunkt der Behandlung (zu 24 h) normalisiert.

Keine Caspasenaktivierung durch Wortmannin/TRAIL

Um den Signalweg der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose in Melanomzellen aufzuklären, wurde die Aktivierung der Caspasen-Kaskade mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Trotz der limitierten Apoptoseinduktion in A-375 und der fehlenden Apoptoseinduktion in A-375-TS nach TRAIL-Behandlung, war die Initiatorcaspase-8 aktiviert, wie das Auftreten der typischen Spaltprodukte von Caspase-8 (43, 41 und 18 kDa) beweist. Die Prozessierung der Effektorcaspase-3 scheint in beiden Zelllinien nach Behandlung mit TRAIL gehemmt zu sein, da nur das intermediäre Spaltprodukt von 20 kDa zu detektieren war (jeweils Spur 2; Abb. 43). Die Caspase-9, deren Aktivierung innerhalb des intrinsischen

Apoptosesignalweges vollzogen wird, war hingegen in keiner der beiden Zelllinien aktiviert. Paradoxe Weise konnte trotz einer verstärkten Apoptose in A-375 und A-375-TS Zellen keine verstärkte Caspasen-Prozessierung durch die Kombinationsbehandlung von Wortmannin und TRAIL nachgewiesen werden (Abb. 43, jeweils Spur 4). Für den Signalweg der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose wurde somit ein Mechanismus angenommen, der die Apoptose unabhängig von der Aktivierung der Caspasenkaskade steuert.

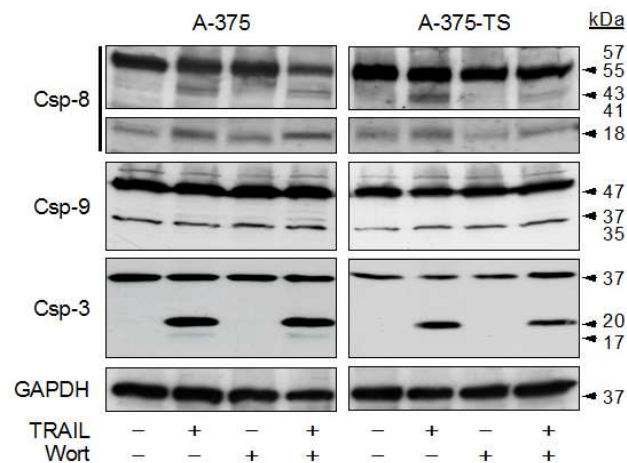


Abbildung 43: Keine Aktivierung der Caspasenkaskade durch Wortmannin/TRAIL.

Die Prozessierung der Caspasen-8,-9 und -3 wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse in A-375 und A-375-TS-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 4 μ M Wortmannin +/- 20 ng/ml TRAIL für 8 h behandelt. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Wortmannin-Behandlung führt zur Produktion von ROS

Für Melanomzelllinien konnte schon früher eine Caspasen-unabhängige Apoptose gezeigt werden, die sich durch ein erhöhtes Level von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) auszeichnete (Franke et al., 2010). Tatsächlich konnten in A-375 und A-375-TS Zellen signifikant erhöhte ROS-Level schon 1 h nach Behandlung mit Wortmannin oder Wortmannin und TRAIL gezeigt werden. In einer zeitkinetischen Analyse konnte bis zu 8 h ein weiterer Anstieg der ROS-Level verzeichnet werden (Abb. 44A). Die TRAIL-Behandlung hingegen zeigte keinen Effekt auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (Abb. 44A, Spalte 1 und 3). Das ROS eine wichtige Rolle in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose spielen könnte, wurde durch die Verwendung von α -Tocopherol (Vitamin E) verdeutlicht. Bei α -Tocopherol handelt es sich um einen Radikalfänger, ein Antioxidant, welches die Sauerstoffradikale bindet und neutralisiert. Vorbehandlung von A-375 und A-375-TS-Zellen für 1 h mit α -Tocopherol blockierte die ROS-Produktion durch Wortmannin vollständig (Abb. 44A, Spalte 4 und 5).

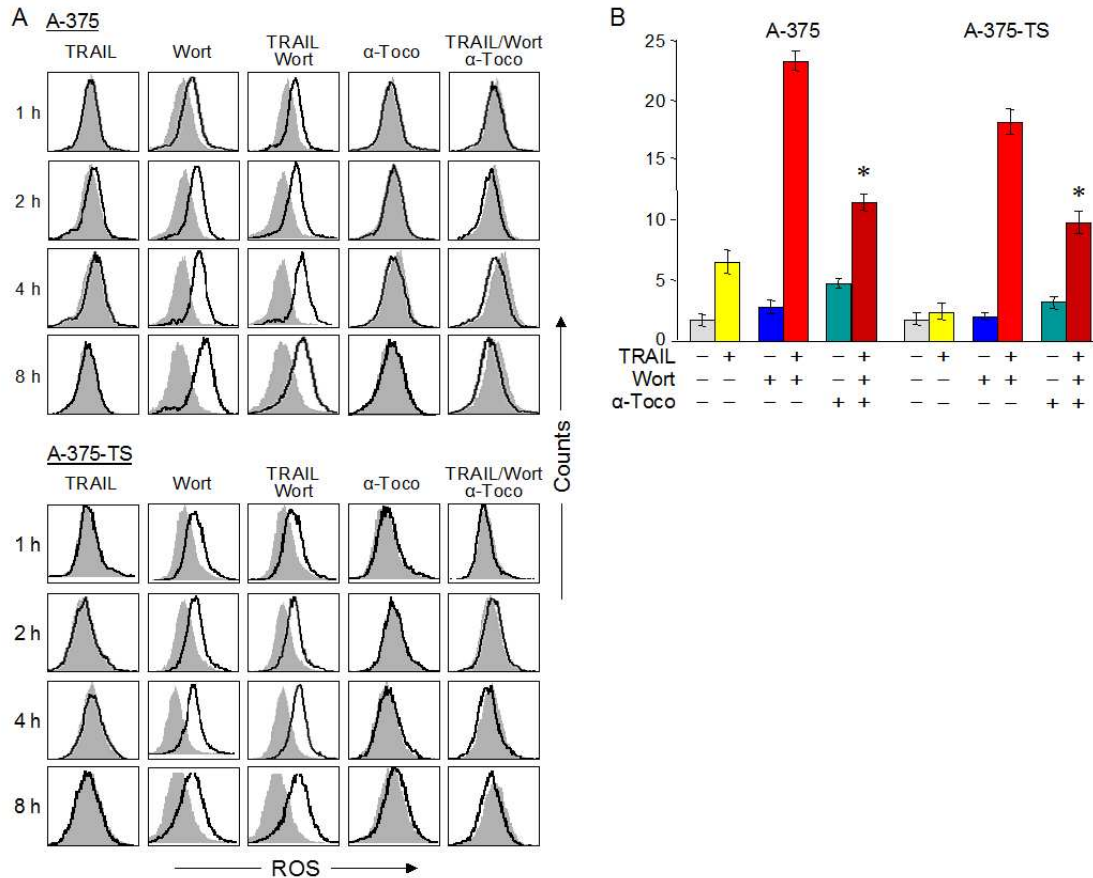


Abbildung 44: Erhöhte Produktion von ROS durch Behandlung mit Wortmannin.

(A) A-375 und A-375-TS Zellen wurden für 1, 2, 4 und 8 h mit 20 ng/ml TRAIL +/- 4 μ M Wortmannin und/oder mit 200 μ M α -Tocopherol für 1 h vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend mit H₂DCFDA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Behandelte Zellen (offene Graphen) wurden mit DMSO-behandelten Kontrollen (graue, gefüllte Graphen) verglichen. Eine höhere Fluoreszenz (Shift nach rechts) korrespondierte mit erhöhten ROS-Leveln. (B) Zeigt die Apoptoseinduktion, gemessen als Prozentsatz der sub-G1-Zellen, in A-375 und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit TRAIL/Wortmannin und/oder nach Vorbehandlung mit α -Tocopherol (200 μ M, 1 h Vorbehandlung). Die Zellzyklusanalyse wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt. Mittelwerte \pm SDs von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * (p < 0,005) gekennzeichnet und beziehen sich auf den Vergleich von dreifach behandelten Zellen (Wortmannin/TRAIL/ α -Tocopherol) zu den Wortmannin/TRAIL-behandelten Zellen. (A, B) Drei unabhängige Experimente, jedes Experiment mit Triplikaten durchgeführt, zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Vorinkubation mit α -Tocopherol war ebenfalls in der Lage, die durch Wortmannin/TRAIL-induzierte Apoptose in beiden Zelllinien um etwa 50% zu verringern. In A-375 Zellen reduzierte die Vorinkubation mit α -Tocopherol die Apoptose von knapp 24% auf etwa 12%. In A-375-TS Zellen war der Effekt etwas weniger ausgeprägt, hier konnte die Apoptose durch die Vorbehandlung mit α -Tocopherol von 18% auf 10% gedrückt werden (Abb. 44B).

Aktivierung des mitochondrialen proapoptotischen Signalweges

Parallel zu der Produktion von ROS konnte in einer zeitkinetischen Analyse die Aktivierung des proapoptotischen, mitochondrialen Signalweges gezeigt werden. Die Behandlung mit 4 μM Wortmannin führte zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi\text{m}$) in A-375 und A-375-TS. Dieser Verlust von $\Delta\psi\text{m}$ konnte schon zu sehr frühen Zeitpunkten detektiert werden (nach 1 h Behandlung) und nahm mit der Zeit (bis zu 8 h) noch weiter zu (Abb. 45A, Spalte 2). Der durch die Behandlung mit Wortmannin hervorgerufene Verlust von $\Delta\psi\text{m}$ konnte durch Vorinkubation mit α -Tocopherol (1 h, 200 μM) vollständig blockiert werden (Abb. 45A, Spalte 4). Dies führte zu der Annahme, dass es eine enge Verbindung zwischen ROS und dem mitochondrialen Apoptosesignalweg gibt.

Neben dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führte die Kombinationsbehandlung aus Wortmannin und TRAIL nach 2 h zu einer signifikanten Freisetzung von proapoptotischen Faktoren (Cytochrom C, SMAC und AIF) aus den Mitochondrien. Sowohl in A-375 als auch in A-375-TS Zellen konnte eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C und SMAC nach nur 2 h Behandlung gezeigt werden (Abb. 45B, Blot 1,2 und 5,6).

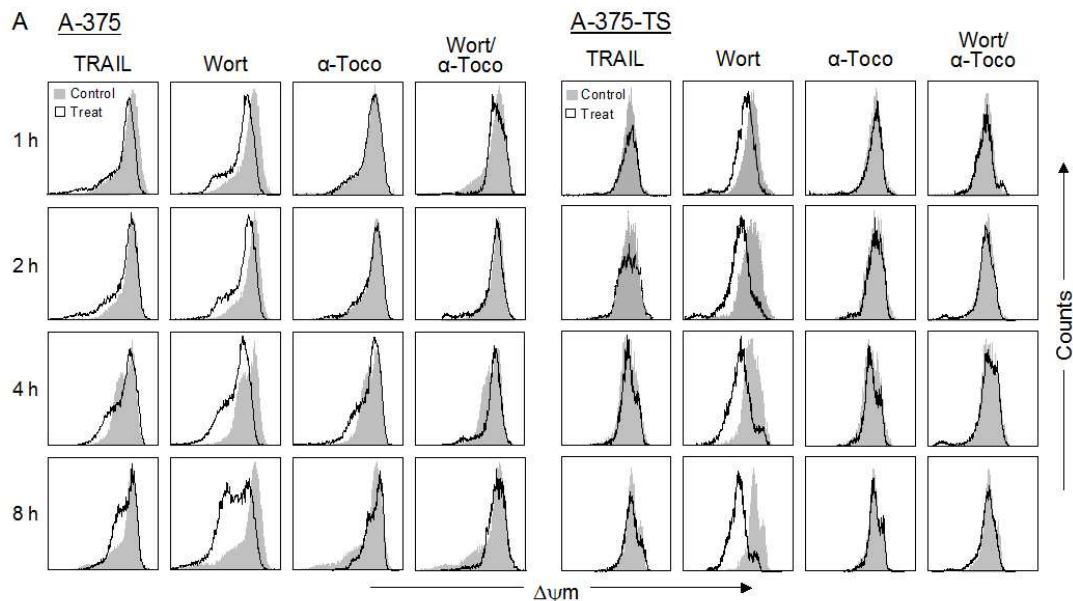


Abbildung 45: Aktivierung des proapoptotischen mitochondrialen Signalweges.

Die nähere Erläuterung zu dieser Abbildung befindet sich in der Abbildungslegende am Ende der Abbildung.

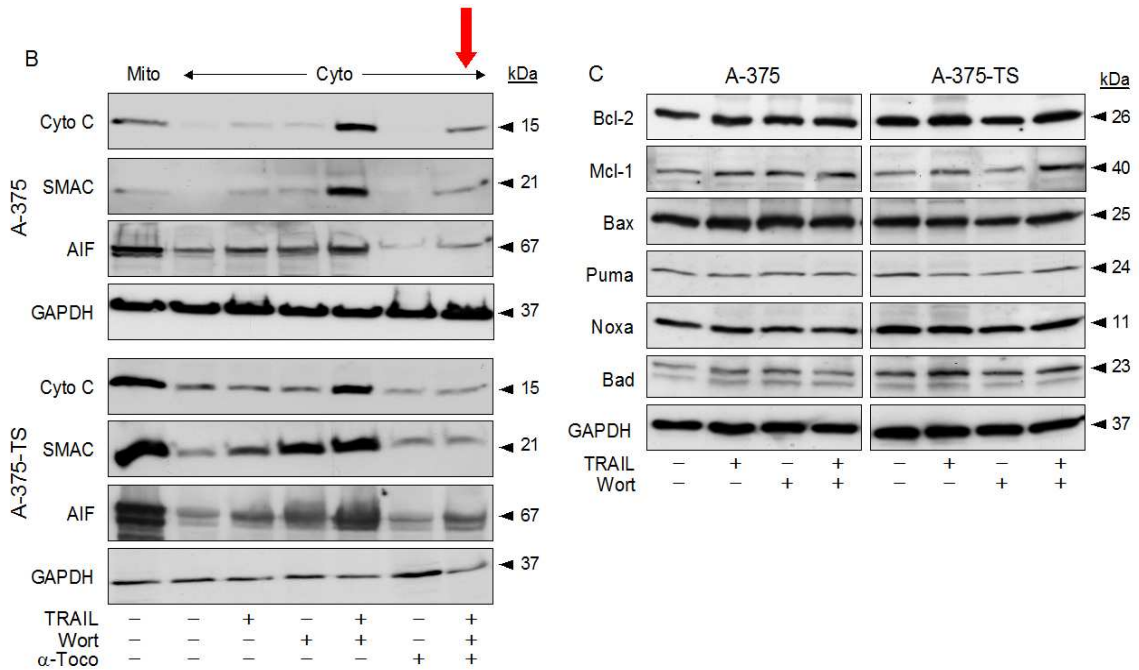


Abbildung 45: Aktivierung des proapoptischen mitochondrialen Signalweges.

(A) Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) wurde nach TMRM⁺-Färbung mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. A-375 und A-375-TS-Zellen wurden für 1-8 h mit 4 μ M Wortmannin und/oder 200 μ M α -Tocopherol (1 h Vorbehandlung) behandelt und anschließend gemessen. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen verglichen (graue Graphen). Drei unabhängige Experimente, jeweils mit Triplikaten durchgeführt, ergaben vergleichbare Resultate. (B) Zytoplasmatische Extrakte (Cyto) von A-375 und A-375-TS Zellen wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse auf die Freisetzung von Cytochrom C, SMAC und AIF untersucht. Die Zellen wurden für 2 h mit Wortmannin, TRAIL und/oder α -Tocopherol (200 μ M, 1 h Vorbehandlung) behandelt. Gleiche Proteinmengen wurden aufgetragen und die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele mit Hilfe von GAPDH überprüft. Ein mitochondrialer Extrakt (Mito) diente als Kontrolle. (C) Die Expression der Bcl-2 Protein in A-375 und A-375-TS-Zellen wurde nach Behandlung mit 4 μ M Wortmannin +/- TRAIL für 8 h bestimmt. Gesamtproteinlysate wurden mittels Western Blot Analyse untersucht und eine gleichmäßige Beladung der Gele wurde mit GAPDH überprüft. Drei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Für AIF zeigten die A-375-TS Zellen eine etwas deutlichere Freisetzung als die parentalen A-375 (Abb. 45B, Vgl. Blot 7 mit Blot 3). Die Freisetzung der proapoptischen Faktoren Cytochrom C, SMAC und AIF aus den Mitochondrien konnte durch die Vorbehandlung mit α -Tocopherol stark vermindert werden (Abb. 45B; letzte Spur; roter Pfeil). Diese frühzeitige Aktivierung des mitochondrialen Signalweges (zu 1 h Verlust des $\Delta\psi_m$, zu 2 h die Freisetzung proapoptischer, mitochondrialer Faktoren) kann aber nicht mit Veränderungen auf der Expressionsebene der Bcl-2-Proteinfamilie erklärt werden. Selbst zu späteren Zeitpunkten (24 h) zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Expressionsverhalten der antiapoptischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 oder der proapoptischen Proteine Bax, Noxa, Puma und Bad (Abb. 45C). Dies legt eine Regulation auf anderer Ebene nahe.

Die Bedeutung von Bcl-2

Obwohl Veränderungen auf der Expressionsebene der Bcl-2 Proteine nicht nachgewiesen werden konnten, wurde mit den nachfolgenden Experimenten die maßgebliche Rolle von Bcl-2 und Bax in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose untersucht und aufgezeigt. Die Behandlung von stabil transfizierten A-375 Zellen mit einem Bcl-2-Überexpressionsplamids (A-375-Bcl-2) und einem Kontrollplasmid (A-375-pIRES) mit Wortmannin und TRAIL führte in dem sensitiven pIRES-Klon zu einer Apoptoseinduktion von 20%. In dem stabil transfizierten A-375 Zellklon blockierte die Bcl-2-Überexpression die durch Wortmannin und TRAIL-induzierte Apoptose nahezu vollständig (Abb. 46A).

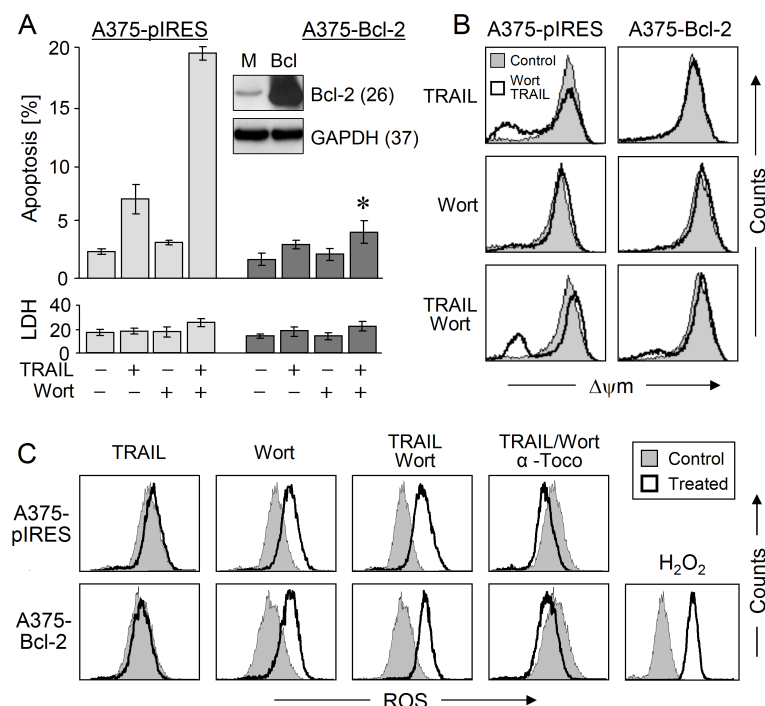


Abbildung 46: Blockierung der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose durch exogenes Bcl-2.

(A) Die durch Behandlung mit Wortmannin+/- TRAIL-induzierte Apoptose wurde in A-375 Zellen, die stabil mit Bcl-2 und einem Kontrollplasmid (A-375-pIRES) transfiziert wurden, untersucht. Die Bcl-2 Expression im pIRES-Kontrollklon (M für Mock) und im Bcl-2-Klon wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht (Einschub). GAPDH diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Mittelwerte \pm SDs von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf den Vergleich von Wortmannin/TRAIL behandelten Zellen in den Bcl-2-transfizierten Klonen zu den Wortmannin/TRAIL-behandelten Zellen in den pIRES-transfizierten Zellen. (B) Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) wurde nach Behandlung mit Wortmannin +/- TRAIL zu 24 h in beiden Subklonen untersucht. Die behandelten Zellen wurden mit TMRM⁺ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollzellen (graue, geschlossene Graphen) verglichen. (C) A-375-pIRES und A-375-Bcl-2 wurden für 24 h mit 4 μ M Wortmannin, 20 ng/ml TRAIL und/oder 200 μ M α -Tocopherol (1 h Vorbehandlung) inkubiert und mit H₂DCFDA gefärbt. Die Entstehung von ROS wurde anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollzellen (graue, geschlossene Graphen) verglichen. H₂O₂-behandelte Zellen (200 mM, 1 h) dienten als Positivkontrollen. (B, C) Drei unabhängige Experimente, die jeweils mit Triplikaten durchgeführt wurden, ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Ebenso wie die Apoptose wurde auch der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ nach Behandlung mit Wortmannin/TRAIL vollständig durch die Bcl-2-Überexpression blockiert (Abb. 46B). Im klaren Gegensatz dazu steht der Einfluss der Bcl-2-Überexpression auf die ROS-Produktion. A-375-Klone mit einem überexprimierten Bcl-2 haben keinen Einfluss auf die ROS-Produktion und können die von Wortmannin/TRAIL produzierten ROS-Level nicht blockieren (Abb. 46C; Spalte 2 und 3). Die Vorbehandlung mit α -Tocopherol führte in beiden Zellklonen (A-375-Mock und A-375-Bcl-2) zu einer Blockierung der ROS-Level (Abb. 46C; Spalte 4). Aufgrund dieser Experimente scheint die Entstehung von ROS durch Behandlung mit Wortmannin unabhängig von der mitochondrialen Antwort zu sein.

Die essenzielle Rolle von Bax in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose

Die Rolle von Bax und Bak wurden in einem HCT-116 Kolonkarzinommodell untersucht. Dieses Zellkulturmodell besteht aus vier Subklonen, den parentalen Zellen mit Bax und Bak (Bax^+/Bak^+), Zellen mit einem Bax knockout (Bax^-/Bak^+), Zellen mit einem Bak Knockdown (Bax^+/Bak^-) und Zellen mit einem Doppelknockdown (Bax^-/Bak^-). Die Behandlung mit Wortmannin und TRAIL für 24 h führte zu einer Apoptoseinduktion von etwa 28% in den parentalen Zellen (Bax^+/Bak^+), ebenso wie in den Zellen mit dem Bak Knockdown, die eine Apoptoseinduktion von 32% nach Kombinationsbehandlung aufzeigten (Abb. 47A). Dies zeigte deutlich, dass Bak in diesem Setting keine entscheidende Rolle spielt. In Bax-defizienten Zellen konnte nach Behandlung mit TRAIL und mit der Kombination aus Wortmannin/TRAIL keine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Abb. 47A). Die doppeldefizienten Zellen erwiesen sich ebenso wie der Bax Knockdown als apoptoseresistent. Die Behandlung mit Wortmannin und der Kombination führte in den parentalen HCT-116-Zellen zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ vergleichbar mit den behandelten Melanomzelllinien (Abb. 47B). Der Knockout von Bax blockierte den durch Wortmannin/TRAIL-induzierten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials vollständig (Abb. 47B). Die Produktion von ROS, induziert durch die Behandlung mit Wortmannin, konnte als völlig unabhängig von Bax gezeigt werden. Vergleichbar zu der Bcl-2-Überexpression (Abb. 47C) konnte auch der Bax-Knockout die ROS-Produktion nicht inhibieren (Abb. 47C). Die vorliegenden Ergebnisse lieferten einen Hinweis darauf, dass die ROS-Produktion ein initialer Schritt in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose ist und oberhalb der Mitochondrien wirkt.

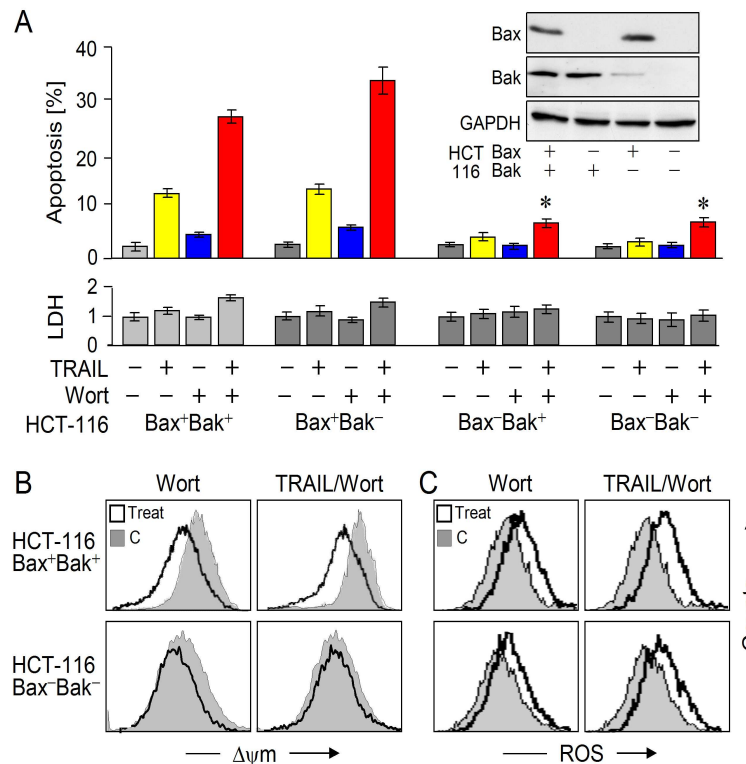


Abbildung 47: Die Rolle von Bax in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose.

(A) Die Apoptoserate (Prozentsatz der sub-G1-Zellpopulation) wurde in einem HCT-116 Kolonkarzinom Zellkulturmodell 24 h nach Behandlung mit Wortmannin +/- TRAIL untersucht. Das HCT-Zellkulturmodell bestehend aus den parentalen Zellen (Bax⁺Bak⁺) und drei Subklonen mit einem Knockdown für Bax und/oder Bak (Bax⁻Bak⁺; Bax⁺Bak⁻; Bax⁻Bak⁻) wurde durchflusszytometrisch nach Propidiumjodidfärbung untersucht. Die statistisch signifikante Reduktion der Apoptose (*; p<0,005) in den Subklonen ist gekennzeichnet und bezieht sich auf den Vergleich von Wortmannin/TRAIL behandelten Zellen in den Bax Knockout und doppelt-defizienten Zellen zu den Wortmannin/TRAIL-behandelten parentalen Kontrollzellen. Einschub: Die Expression bzw. der Knockdown von Bax und Bak wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft, wobei GAPDH als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente. (B) Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\psi_m$ wurde in parentalen und doppelt defizienten HCT-116-Zellen nach Behandlung für 2 h mit 4 μ M Wortmannin oder Wortmannin/TRAIL mit Hilfe der Durchflusszytometrie, nach TMRM⁺-Färbung, bestimmt. Behandelte Zellen (offene Graphen) wurden mit DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. (C) ROS-Level wurden in parentalen und doppelt defizienten HCT-116 Zellen nach Behandlung mit 4 μ M Wortmannin oder Wortmannin/TRAIL untersucht. Die Zellen wurden für 2 h behandelt, mit H₂DCFDA gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B, C) Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente, jedes mit Dreifachwerten, untersucht. Diese ergaben in hohem Maße vergleichbare Ergebnisse.

Aufschluss über die essenzielle Bedeutung von Bax in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose lieferten die Untersuchungen zur Bax-Aktivierung. In A-375 und A-375-TS Zellen konnte eine Translokation von Bax an die Mitochondrien zu einem frühen Zeitpunkt nachgewiesen werden. Schon 2 h nach Behandlung mit Wortmannin in A-375-TS (Abb. 48A; rechter Blot; Spur 4) und nach Behandlung mit Wortmannin/TRAIL in A-375 (Abb. 48A; linker Blot; Spur 5) und A-375-TS (Abb. 48A; rechter Blot; Spur 5) konnte eine Translokation von Bax an die Mitochondrien in den mitochondrialen Extrakten nachgewiesen werden. Um diesen Aktivierungsschritt zu bestätigen wurden die Zellen (A-375 und A-375-TS) behandelt und mit einem konformationspezifischen Antikörper (Bax-NT; (Upton et al., 2007)), der an

den durch Konformationsänderung freigelegten N-Terminus von Bax bindet, inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Eine zeitabhängige Untersuchung (1-8 h) zeigte eine signifikante Aktivierung von Bax (Verschiebung des Graphen nach rechts) in A-375 und A-375-TS schon 2 h nach Wortmanninbehandlung (Abb. 48B, Spalte 2). Wohlgermerkt war die Aktivierung von Bax kein Resultat einer Apoptoseinduktion, da zu diesem frühen Zeitpunkt (2 h) noch keine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden konnte. Die Aktivierung von Bax konnte direkt als Reaktion auf die Wortmanninbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 48B).

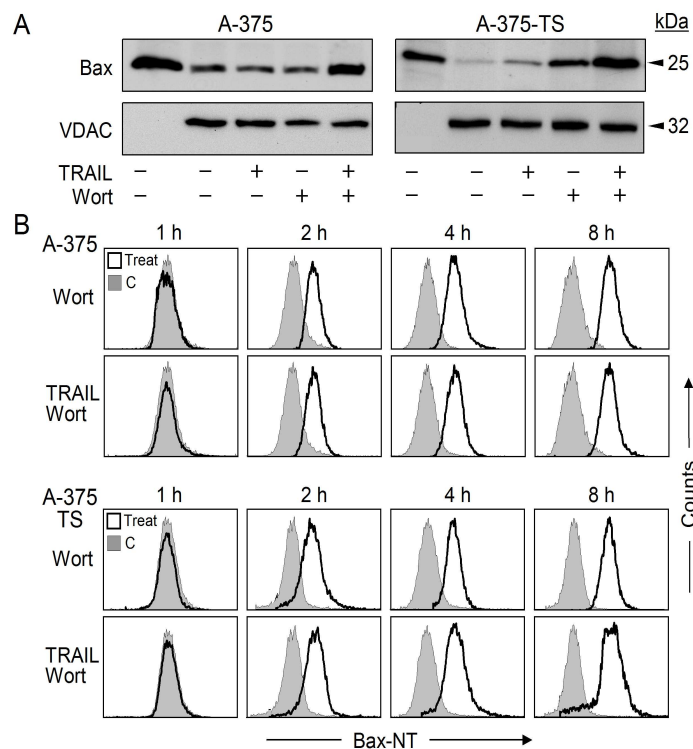


Abbildung 48: Aktivierung von Bax durch Wortmannin.

(A) Mitochondriale Extrakte (Mito) von A-375 und A-375-TS, die für 2 h mit 4 μ M Wortmannin +/- TRAIL behandelt wurden, wurden auf eine Bax Translokation mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft. Gleichmäßige Beladung wurde mittels des mitochondrialen Proteins VDAC nachgewiesen. Der Auftrag eines zytosolischen Extraktes (Cyto) diente als Kontrolle. Drei voneinander unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. (B) A-375 und A-375-TS Zellen wurden in einer Zeitkinetik (1-8 h) mit Wortmannin (4 μ M) oder Wortmannin/TRAIL behandelt, mit einem konformationsspezifischen Antikörper für Bax (Bax-NT) inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse wurde in drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Dreifachwerte gemessen wurden, ausnahmslos bestätigt.

Wortmannin aktiviert Bax durch Veränderungen des Phosphorylierungsstatus

Um die Verbindung zwischen Kinaseninhibition und Bax-Aktivierung zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsstatus von Bax in verschiedenen Experimenten analysiert. Untersucht wurden zwei, für Bax essenzielle, Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung von Bax an Serin-184 wurde als inaktivierender Schritt, die Phosphorylierung an Threonin-167 als aktivierender Schritt beschrieben (Kim et al., 2006a). Der Phosphorylierungsstatus von Bax

wurde, nach Permeabilisierung und Färbung der Zellen mit phosphospezifischen Antikörpern, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Verlässlichkeit der hier verwendeten Phospho-Antikörper wurde in dem HCT-116 Kolonkarzinommodell, insbesondere in den Wildtyp- und den Bax-defizienten Zellen, getestet, um eine unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen (Abb. 49A).

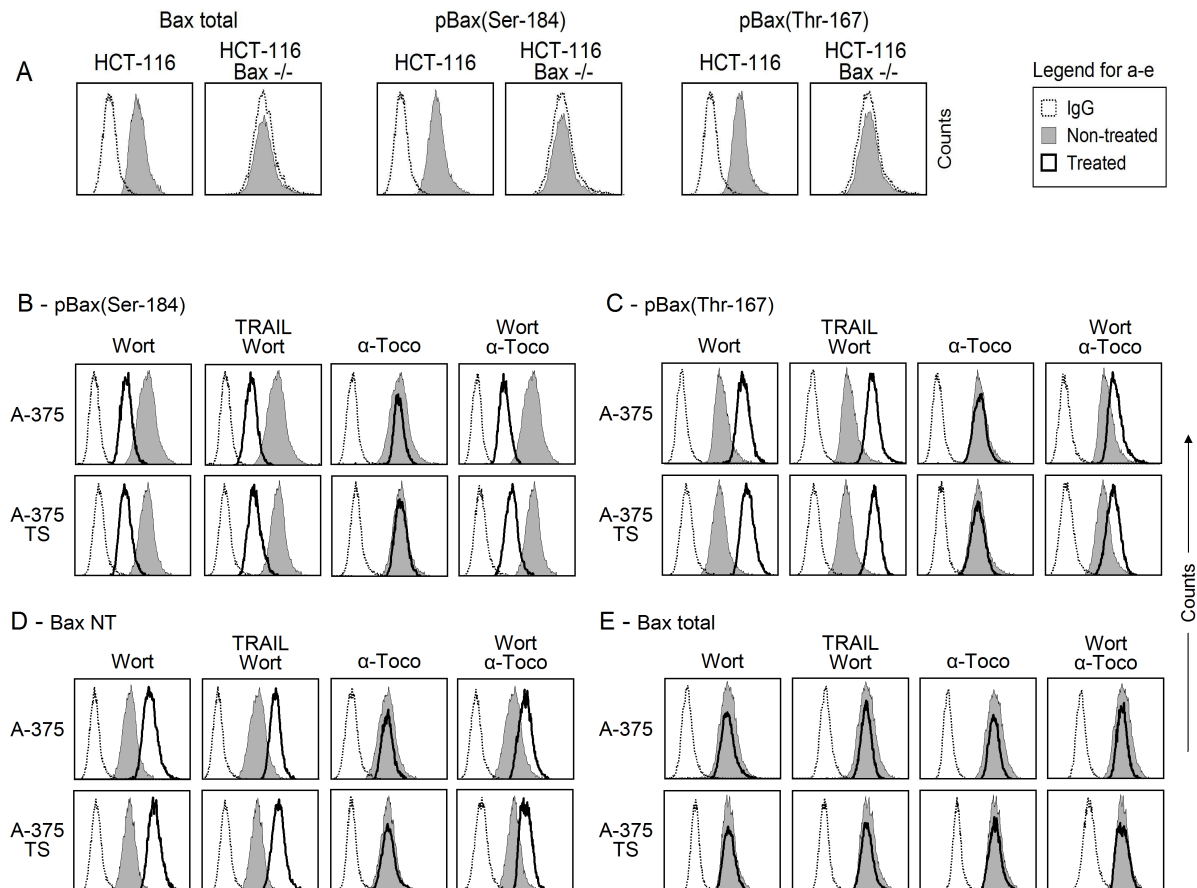


Abbildung 49: Wortmannin beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von Bax.

(A) Signale für Bax wurden durchflusszytometrisch für parentale HCT-116 Zellen (Bax⁺/Bak⁺) und Bax-defiziente Zellen (Bax⁻/Bak⁺) miteinander verglichen. Dafür wurden Antikörper sowohl gegen Bax (Gesamtprotein) als auch phosphospezifische Antikörper gegen Bax (p-Bax Serin-184 und p-Bax Threonin-167) verwendet. Drei unabhängige Experimente wiesen in hohem Maße vergleichbare Ergebnisse auf. Unbehandelte Zellen (graue Graphen) wurden als Overlay mit IgG1-gefärbten Kontrollen (offene, gestrichelte Graphen) gezeigt. (B-E) A-375 und A-375-TS Zellen wurden für 2 h mit Wortmannin (4 μM), Wortmannin/TRAIL und/oder α-Tocopherol (200 μM, 1 h Vorbehandlung) behandelt. Für die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit den spezifischen Antikörpern für p-Bax (Ser-184)(B), für p-Bax (Thr-167)(C), für die aktivierende Konformationsänderung (Bax-NT; D) und für das Gesamtprotein Bax (E) gefärbt. Die behandelten Zellen (offene Graphen) sind als Overlay mit den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) und den IgG1-gefärbten Kontrollen (gestrichelte Graphen) dargestellt. Zwei vollständige und unabhängige Experimente, die jeweils mit Triplikaten durchgeführt wurden, wurden gemessen und ergaben übereinstimmende Ergebnisse.

Die Behandlung von A-375 und A-375-TS mit Wortmannin führte nach 2 h zu einer Aktivierung von Bax, gezeigt für den Bax-NT-Assay (Abb. 49D). Parallel dazu konnten auch für den Phosphorylierungsstatus von Bax bedeutende Veränderungen nach 2 h Wortmanninbehandlung nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der deaktivierenden

Serin-184 Stelle war vermindert (Abb. 49B; Spalte 1-2), während die Phosphorylierung der aktivierenden Threonin-167 Stelle deutlich verstärkt war (Abb. 49C; Spalte 1-2). Dies verdeutlichte die Annahme, dass Wortmannin, obwohl es selbst keine Apoptose in Melanomzellen induzieren kann, doch für eine Neuprogrammierung der Melanomzellen in Bezug auf die Apoptosesensitivität sorgt. Der Phosphorylierungsstatus von Bax scheint für diese erhöhte Apoptosesensitivität von essenzieller Bedeutung zu sein.

Um nun auch noch die Rolle von ROS in diesem Sensitivierungs-Signalweg aufzuklären, wurden die Melanomzelllinien zusätzlich mit α -Tocopherol behandelt. Das Antioxidant selbst hat keinen Effekt auf die Bax-Phosphorylierung, aber die Wortmannin-vermittelten Veränderungen der Bax Threonin-167 Phosphorylierungsstelle wurden nahezu vollständig durch α -Tocopherol blockiert (Abb. 49C; Spalte 3-4). Im Gegensatz dazu wurde die verminderte Phosphorylierung der Serin-184-Phosphorylierungsstelle nicht durch den Radikalfänger α -Tocopherol beeinflusst (Abb. 49B; Spalte 3-4). Die Reduktion der Phosphorylierung an Bax Threonin-167 ging mit einer verminderten Bax-Aktivierung einher, die mit Hilfe des aktivierungsspezifischen Antikörpers (Bax-NT) untersucht wurde (Abb. 49D). Zur Kontrolle wurde ein Antikörper gegen Bax (Gesamtprotein) verwendet, dessen Signale durch die Behandlung mit Wortmannin und/oder α -Tocopherol nicht verändert wurden (Abb. 49E). Die Aktivierung von Bax (Bax-NT-Signal) konnte jedoch von α -Tocopherol nicht komplett blockiert werden (Abb. 49D; Spalte 4), was einen Hinweis darauf lieferte, dass die Phosphorylierung der essenziellen Bax-Phosphorylierungsstellen unterschiedlich reguliert wird und, dass die Phosphorylierung von Threonin-167 nur einen Arm der Bax-Aktivierung repräsentiert. Die vorliegenden Analysen bestätigten eine ROS-Abhängigkeit der Bax-Aktivierung über Threonin-167, während sich der andere Arm, die verminderte Phosphorylierung der inaktivierenden Serin-184 Stelle, als völlig unabhängig von ROS darstellte (Abb. 49B; Spalte 4).

Modell zur Sensitivierung durch Wortmannin

Das nachfolgende Modell erklärt den Signalweg der Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch den PI3-Kinaseinhibitor Wortmannin. Die Behandlung mit TRAIL resultiert in eine Aktivierung der Caspase-8. Die aktivierte Caspase-8 sorgt für die Spaltung von Bid zu tBid und damit für die Aktivierung von Bid. Dies führt allerdings nicht zu einer vollständigen Caspasenprozessierung, wie an der unvollständigen Prozessierung der Effektorcaspase-3 zu sehen ist (Abb. 43) und zu einer Apoptoseinduktion, da Bcl-2 weiterhin zu stark exprimiert wird und den mitochondrialen Signalweg blockieren kann. Die Wortmannin-vermittelte Blockierung der PI3-Kinase sorgt für eine Herunterregulation der Phosphorylierungen von

Akt/PKB und führt zu der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS). Akt/PKB reguliert die inaktivierende Phosphorylierungsstelle von Bax (p-Bax-Ser184). Wortmannin reguliert über ROS die Threonin-Phosphorylierung von Bax (p-Bax-Thr167). Der Anstieg in der aktivierenden Bax-Phosphorylierung steht in enger Verbindung mit der Aktivierung von Bax und dessen mitochondrialer Translokation. Die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 konnte diesen Signalweg vollständig blockieren. Eine effiziente Induktion der Apoptose war nur nach Kombination beider Wirkstoff (Wortmannin und TRAIL) möglich. Die Inhibition der PI3K durch Wortmannin aktivierte den mitochondrialen Apoptosesignalweg und bereitete die Melanomzellen für die durch TRAIL-induzierte Apoptose vor. Letztendlich wirkt das durch TRAIL und Caspase-8 aktivierte Bid deaktivierend auf Bcl-2, verstärkt den durch Bax-Aktivierung initiierten mitochondrialen Signalweg und dies resultiert in der Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien. Die reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) sind in der Lage sowohl die Initiatorcaspase-9 als auch die Effektorcaspase-3 zu blockieren, was die unvollständige Prozessierung der Caspasen erklären könnte. Die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien könnte durch einen Caspasen-unabhängigen Weg die TRAIL-induzierte Apoptose verstärken (Abb. 50).

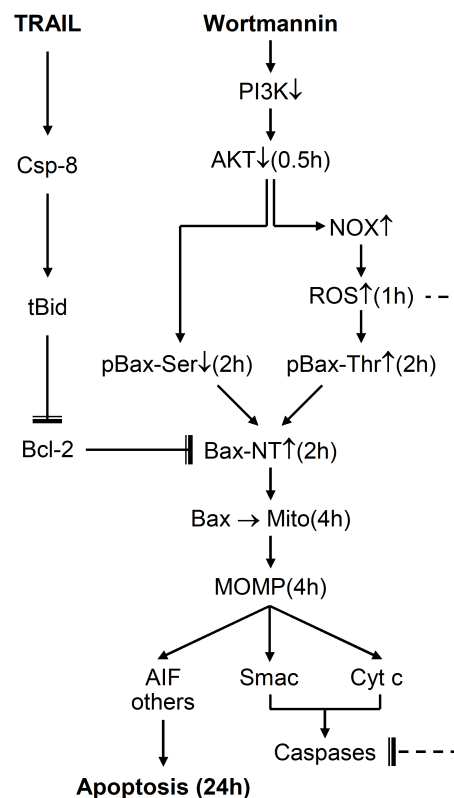


Abbildung 50: Modell zur Sensitivierung von Melanomzellen durch Wortmannin.

Das Modell stellt eine Übersicht über die synergistische Interaktion von Wortmannin und TRAIL dar.

Strategie III - Sensitivierung durch den mTOR-Kinaseinhibitor Rapamycin

Antiproliferative Effekte von Rapamycin

Rapamycin kann sowohl zur Blockierung des mTOR-Komplexes I (Anwendung von Rapamycin im nM-Bereich), als auch zur Blockierung des mTOR-Komplexes II (Anwendung von Rapamycin im μ M-Bereich) und damit zur Autophagie führen (Dancey, 2010). Die Behandlung von A-375-TS Zellen für 24 h mit 1 und 2 μ M Rapamycin führte zu einer verstärkten Expression des Autophagiemarkers Beclin-1 und zu einer Spaltung des Autophagiemarkers LC3 (Abb. 51A). Der mTOR-Komplex II ist wahrscheinlich für die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin-473, und damit für die vollständige Aktivierung von Akt, zuständig. Die Behandlung von A-375 und A-375-TS Zellen für 2 h mit steigenden Konzentrationen Rapamycin (10-160 nM) zeigte für die beiden höchsten Konzentrationen (80 nM, 160 nM) eine leicht verminderte Akt-Phosphorylierung an Serin-473, während die Expressionslevel des Gesamtproteins Akt keine Veränderungen nach Rapamycinbehandlung zeigten (Abb. 51B). In Zellzyklus- und Proliferationsanalysen konnten die antiproliferative Effekte von Rapamycin deutlich gezeigt werden. Die Behandlung von bis zu sechs Melanomzelllinien (A-375, A-375-TS, Mel-HO, Mel-HO-TS, MeWo und Mel-2a) für 24 h mit 80 nM Rapamycin führte zu einem starken G1-Arrest (Abb. 51C). Um diese Effekte noch deutlicher hervorzuheben wurde eine Echtzeit-Zellanalyse gemacht, bei der über einen Zeitraum von bis zu 96 h kontinuierlich Zellwachstum und Zelladhäsion untersucht werden können. Direkt nach Zugabe von 80 nM Rapamycin zeigte sich in allen sechs Zelllinien eine deutliche Reduktion des Zellwachstums, die zum Zeitpunkt von 48 h zu einem Wachstumsarrest führte (Abb. 51D). Eine dosisabhängige Abnahme des Zellwachstums konnte in A-375, A-375-TS, Mel-HO und Mel-HO-TS Zellen mit Hilfe des WST-1 Assays gezeigt werden (Abb. 51E).

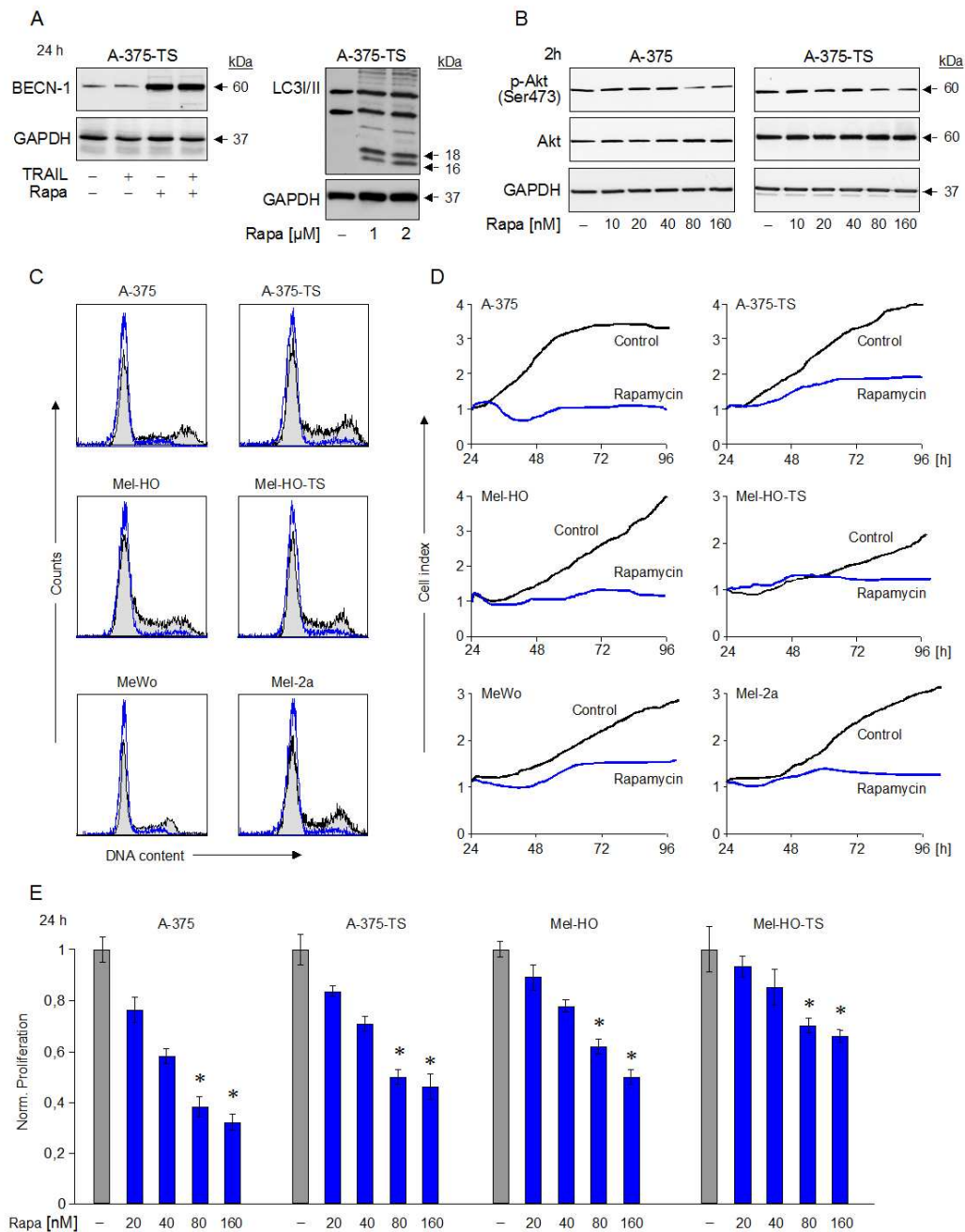


Abbildung 51: Antiproliferative Effekte von Rapamycin.

(A) Hochregulation bzw. Spaltung der Autophagiemarker Beclin-1 und LC-3 nach Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ Rapamycin +/- TRAIL und $1\text{-}2 \mu\text{M}$ Rapamycin für 24 h. (B) Konzentrationsabhängige Veränderungen der Phosphorylierung von Akt an der Phosphorylierungsstelle Serin-473 nach Behandlung mit $10\text{-}160 \text{ nM}$ Rapamycin. (A, B) Die Proteine wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse in A-375 und A-375-TS Zellen untersucht. Die Expression von Akt (Gesamtprotein) diente als Kontrolle. Eine gleichmäßige Beladung der SDS-Gele mit $30 \mu\text{g}$ Protein wurde mittels GAPDH überprüft. Zwei voneinander unabhängige Experimente lieferten vergleichbare Resultate. (C) Zellzyklusanalysen von sechs verschiedenen Melanomzelllinien, die für 24 h mit 80 nM Rapamycin (blaue Graphen) behandelt und zu DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen wurden, sind gezeigt. (D) Zeigt Wachstumskurven von A-375, A-375-TS, Mel-HO, Mel-HO-TS, MeWo und Mel-2a nach Behandlung mit 80 nM Rapamycin im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen, gemessen mit der Echtzeit-Zellanalyse. Die Zellindizes wurden zum Zeitpunkt der Behandlung ($t = 24 \text{ h}$) normalisiert. (E) Mit Hilfe des WST-1 Assays konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung der Zellproliferation in A-375, A-375-TS, Mel-HO und Mel-HO-TS Zellen gezeigt werden. Mittelwerte und Standardabweichungen (SDs) aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachwerten sind gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Studentischem t-Test berechnet und bei einem p-Wert $< 0,005$ mit * gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz ist gegeben, wenn man die Rapamycin-behandelten Zellen mit den DMSO-behandelten Kontrollen vergleicht.

Rapamycin sensitiviert für die TRAIL-induzierte Apoptose

Die hier untersuchte Strategie zur Überwindung der TRAIL-Resistenz in Melanomzelllinien beinhaltete den mTOR-Inhibitor Rapamycin. Kombinationen von Rapamycin und TRAIL wurden in TRAIL-sensitiven Melanomzelllinie (A-375, Mel-HO), in Zellen mit einer induzierten TRAIL-Resistenz (A-375-TS, Mel-HO-TS) und in permanent resistenten Zelllinien (Mel-2a, MeWo) untersucht. Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe der Zellzyklusanalyse untersucht (sub-G1-Zellen; Zellen mit fragmentierter DNS; Abb. 52A). Eine Apoptoseinduktion durch die Einzelbehandlung mit 80-160 nM Rapamycin konnte nach 24 h nicht nachgewiesen werden. Die Monobehandlung mit TRAIL zeigte eine moderate Apoptoseinduktion von 5-12% in den TRAIL-sensitiven Zelllinien Mel-HO und A-375. Nach Behandlung mit der Kombination aus Rapamycin und TRAIL konnte eine deutliche Verstärkung der Apoptose in vier von sechs untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Die sensitiven Zelllinien reagierten mit einer Apoptoseinduktion von 18% in Mel-HO bis zu 32% in A-375, die TRAIL-selektierten Zellen (A-375-TS und Mel-HO-TS) mit einer Apoptoseinduktion zwischen 13% und 25% (Abb. 52B). Die permanent resistenten Zellen erwiesen sich auch nach Kombinationsbehandlung mit Rapamycin und TRAIL als resistent und konnten nicht für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden. Zu diesem Zeitpunkt (24 h) spielte die Zytotoxizität (Messung des freigesetzten LDH) keine große Rolle (Abb. 52B). Die Induktion der Apoptose führte zu einem signifikanten Verlust der Zellproliferation. In Echtzeit-Zellanalysen mit dem xCELLigence System der Firma Roche konnte in A-375, A-375-TS, Mel-HO und Mel-HO-TS Zellen nach der Behandlung mit 80 nM Rapamycin und 20 ng/ml TRAIL ein deutlicher Verlust des Zellwachstums und der Zelladhäsion (rote Kurven) aufgezeigt werden. Die permanent-resistenten Zelllinien MeWo und Mel-2a zeigten zwar den durch Rapamycin-Behandlung hervorgerufenen Proliferationsarrest (blaue Kurve), der jedoch durch die Kombination mit TRAIL nicht verstärkt werden konnte (rote Kurve; Abb. 52C). Vergleichbare Daten lieferte die Untersuchung der Proliferation mit dem WST-1 Assay. Die vier Zelllinien, die ein Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung gezeigt haben, zeigten auch in diesem Assay einen erhöhten Verlust der Proliferation nach Rapamycin/TRAIL-Behandlung (Abb. 52D).

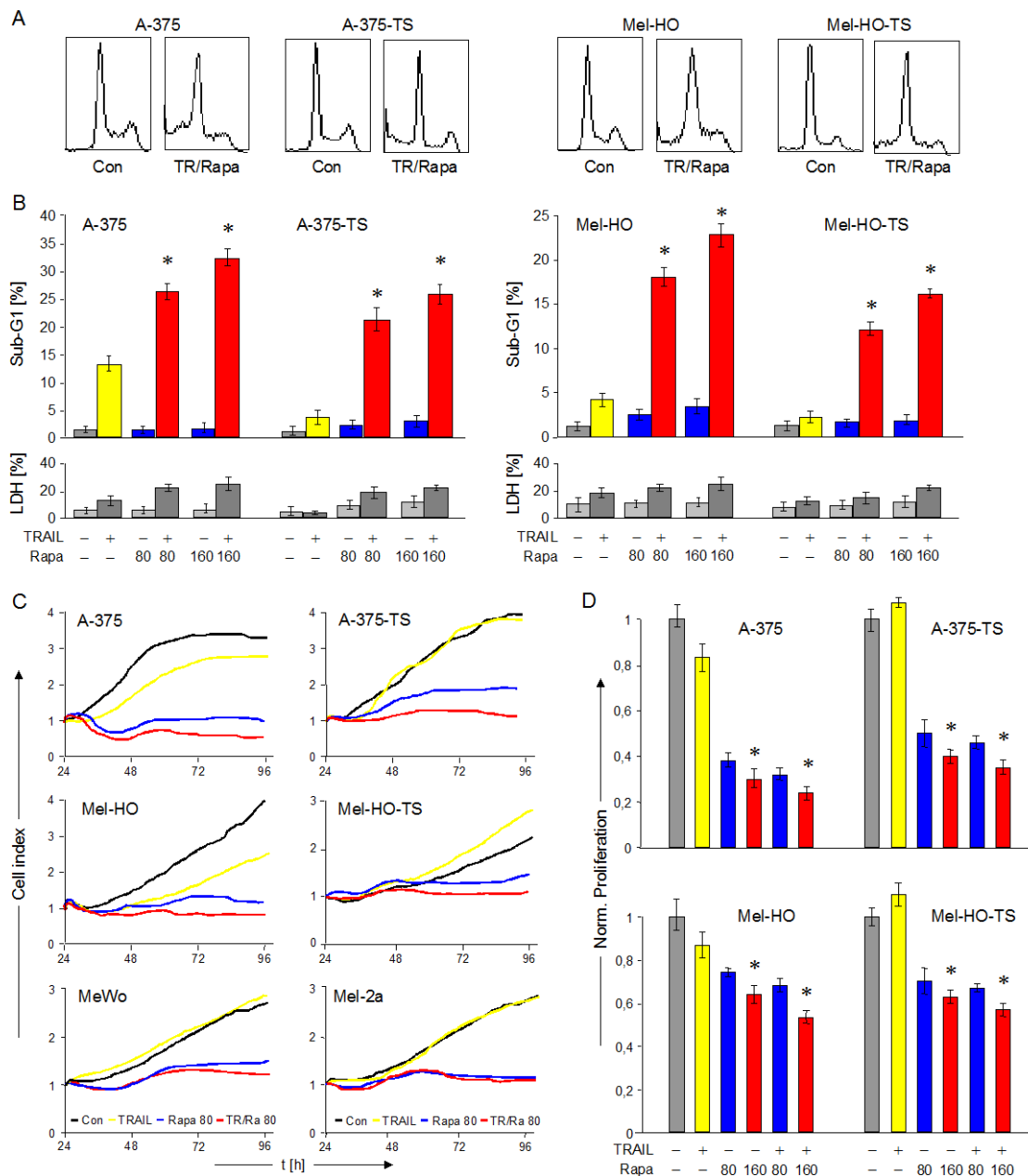


Abbildung 52: Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mit Rapamycin.

(A) Die Auswertung der Zellzyklus-Analysen mit Hilfe der Histogramme zeigte die Apoptoseinduktion (Zunahme der sub-G1 Population (sG1)) in A-375, A-375-TS, Mel-HO und Mel-HO-TS nach Behandlung mit 80 nM Rapamycin und 20 ng/ml TRAIL (jeweils das zweite Histogramm) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen (jeweils das erste Histogramm). (B) In Zellzyklusanalysen wurde die Apoptoseinduktion (Prozentsatz von sub-G1-Zellen) in vier Melanomzelllinien (A-375, A-375-TS, Mel-HO, Mel-HO-TS) nach Behandlung mit Rapamycin (80, 160 nM) +/- TRAIL untersucht. Die Zytotoxizität wurde mit einem Assay zur Bestimmung der freigesetzten LDH-Menge parallel ermittelt. (C) Zeigt eine Echtzeit-Zellanalyse von sechs verschiedenen Melanomzelllinien, die mit TRAIL (gelbe Linie), Rapamycin (blaue Linie) und Rapamycin/TRAIL (rote Linie) behandelt wurden. Als Kontrolle wurden DMSO-behandelte Zellen verwendet (schwarze Linie). Die Zellindizes wurden auf den Zeitpunkt der Behandlung ($t = 24$ h) normalisiert. (D) Untersuchung der verminderten Zellproliferation in A-375, A-375-TS, Mel-HO und Mel-HO-TS Zellen nach Behandlung mit Rapamycin (80, 160 nM) +/- TRAIL (20 ng/ml) mit Hilfe des WST-1 Assays. (B, D) Mittelwerte \pm SDs von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf den Vergleich von Rapamycin/TRAIL behandelten Zellen zu TRAIL-behandelten Zellen.

Keine Caspasenaktivierung durch Rapamycin/TRAIL

Um den Signalweg der Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose in Melanomzellen aufzuklären, wurden verschiedene Experimente zur Untersuchung der Expression der Bcl-2-Proteine, der cIAPs und der TRAIL-Rezeptoren sowie die Aktivierung der Caspasenkaskade mit Hilfe der Western Blot Analyse durchgeführt. Es konnte trotz der limitierten Apoptoseinduktion in A-375 von 12% und der fehlenden Apoptoseinduktion in A-375-TS nach TRAIL-Behandlung eine Aktivierung der Initiatorcaspase-8 gezeigt werden, wie anhand der auftretenden typischen Spaltprodukte von Caspase-8 (43, 41 und 18 kDa) zu sehen ist. Die Behandlung mit TRAIL führte in den A-375-TS Zellen zu einer unvollständigen Prozessierung der Effektorcaspase-3, da nur das intermediäre Spaltprodukt von 20 kDa zu detektieren war (Abb. 53A; Spur 2) und die Kombinationsbehandlung mit Rapamycin/TRAIL führte trotz einer verstärkten Apoptoseinduktion von 32% nicht zu einer verstärkten Caspase-3-Prozessierung (Abb. 53A; Spur 4). Die Initiatorcaspase-9, deren Aktivierung innerhalb des intrinsischen Apoptosesignalweges eine wichtige Rolle spielt, wurde in den A-375-TS Zellen weder durch TRAIL noch durch die Kombination aktiviert. Die Behandlung der parentalen A-375 Zellen mit TRAIL diente als Positivkontrolle für die Aktivierung der Caspasen (Abb. 53A; Spur 6). Für den Signalweg der Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose in A-375-TS Zellen wurde somit ein Mechanismus angenommen, der die Apoptose unabhängig von der Aktivierung der Caspasenkaskade steuert. Gleichzeitig konnten keine Regulationen in der Expression der TRAIL-Rezeptoren und des NF- κ B-Signalweges ($I\kappa$ B α) durch Behandlung mit Rapamycin oder der Kombination nachgewiesen werden (Abb. 53B, Spur 3-4).

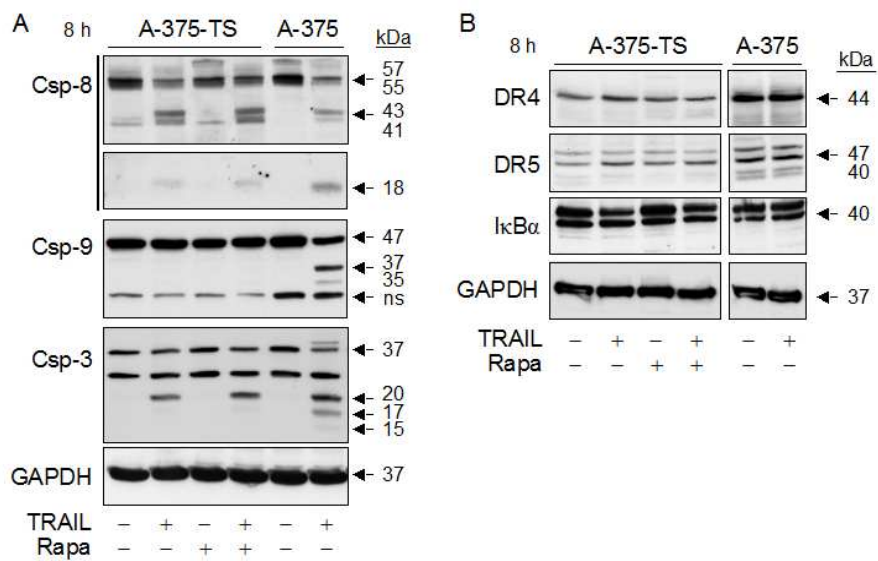


Abbildung 53: Keine Aktivierung der Caspasenkaskade und der Todesrezeptoren durch Rapamycin.
Die nähere Erläuterung der Abbildung 53 erfolgt am Ende der Abbildung.

Keine Regulation der Bcl-2-Proteine und der IAPs

Auch in der Expression der antiapoptotischen Proteine (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) sowie der proapoptotischen Proteine (Bax, Bad, PUMA und Noxa) konnten durch die Behandlung mit Rapamycin oder Rapamycin/TRAIL keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 53C; Spur 3-4). Die Behandlung von A-375-TS Zellen mit Rapamycin und Rapamycin/TRAIL zeigte in den Untersuchungen der zellulären Inhibitoren der Apoptose XIAP und Survivin keine bedeutenden Veränderungen der Expressionslevel (Abb. 53D; Spur 3-4).

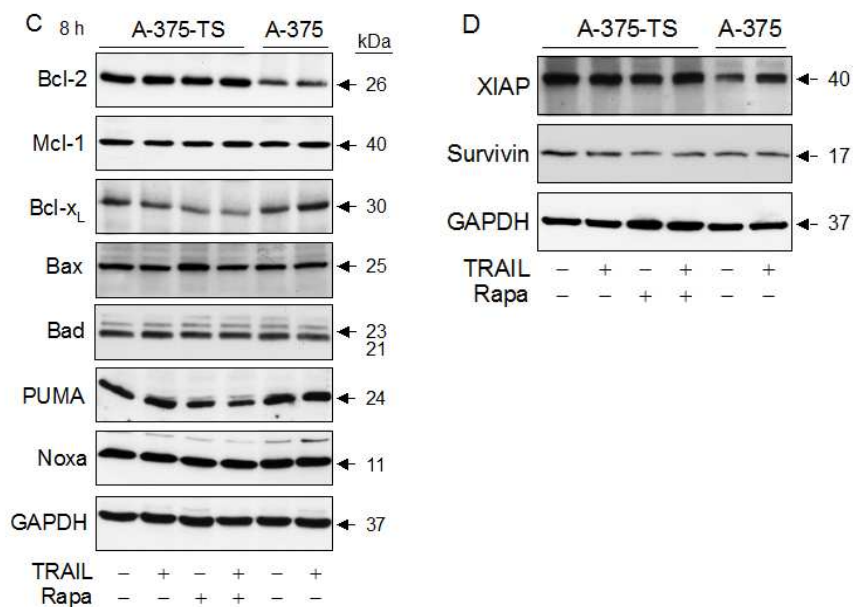


Abbildung 53: Keine Aktivierung der Caspasenkaskade, der TRAIL-Rezeptoren, der Bcl-2-Proteine und der cIAPs durch Rapamycin/TRAIL.

(A) Die Prozessierung der Caspasen-8,-9 und -3, (B) die Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4, DR5 und von I κ B α , (C) die Expression verschiedener anti- und proapoptotischen Bcl-2-Proteine und (D) die Expression der zytosolischen IAPs XIAP und Survivin wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse in A-375-TS-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 80 nM Rapamycin +/- 20 ng/ml TRAIL für 8 h behandelt. Die Behandlung der parentalen A-375 Zellen mit 20 ng/ml TRAIL diente als Kontrolle. Gleiche Proteinnengen (30 μ g) wurden aufgetragen und die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele mit Hilfe von GAPDH überprüft. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und Produktion von ROS

Die Behandlung von A-375 mit TRAIL führte zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, wobei die Subpopulation der Zellen mit einem verminderten Membranpotential $\Delta\psi_m$ der Menge an apoptotischen Zellen entspricht (Abb. 54A). Für die Behandlung mit Rapamycin/TRAIL konnte nach 24 h die Aktivierung des proapoptotischen, mitochondrialen Signalweges sowohl in A-375 als auch A-375-TS Zellen gezeigt werden. Die Behandlung mit 80 nM Rapamycin und 20 ng/ml TRAIL führte zu einem Verlust des

mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) in der apoptotischen Population von A-375 und A-375-TS (Abb. 54A; Spalte 3). Parallel zu der Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ wurde die Produktion von ROS durch Behandlung mit Rapamycin untersucht (Abb. 54B). Die Behandlung von A-375 und A-375-TS für 24 h mit 80 nM Rapamycin führte zu einem deutlichen Anstieg reaktiver Sauerstoffradikale (Abb. 54B, Spalte 2), zu sehen an der Rechtsverschiebung des blauen Graphen. Nach Kombinationsbehandlung konnte weder ein additiver noch synergistischer Anstieg der ROS-Level aufgezeigt werden (Abb. 54B, Spalte 3). Der durch die Behandlung mit Rapamycin hervorgerufene Anstieg von ROS konnte in beiden Zelllinien durch Vorbehandlung mit α -Tocopherol (1 h, 200 μ M) vollständig blockiert werden (Abb. 54B, Spalte 4). Dies führte zu der Annahme, dass, ähnlich zum Wortmannin-Projekt, die Entstehung von ROS durch die Behandlung mit Rapamycin eine entscheidende Rolle in der Rapamycin-vermittelten TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen spielt. Die Rolle von ROS wurde zusätzlich in Experimenten zur Apoptoseinduktion untersucht. Vorbehandlung von A-375 und A-375-TS-Zellen für 1 h mit α -Tocopherol blockierte die durch Rapamycin/TRAIL-induzierte Apoptose zu etwa 50%. In A-375 Zellen reduzierte die Vorinkubation mit α -Tocopherol die Apoptose von 32% auf etwa 15%. In A-375-TS Zellen konnte die Apoptose durch Vorbehandlung mit α -Tocopherol von 22% auf 12% gedrückt werden (Abb. 54C).

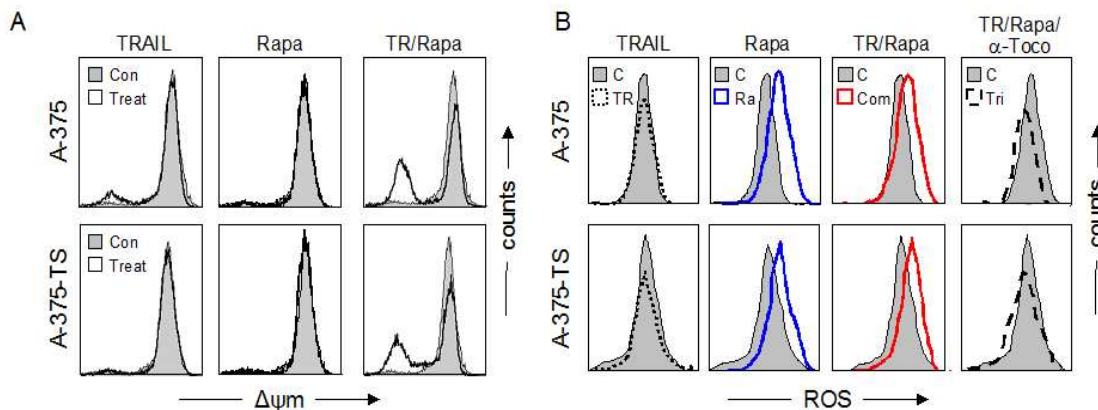


Abbildung 54: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und ROS.
Nähere Erläuterungen siehe Abbildungslegende auf der folgenden Seite.

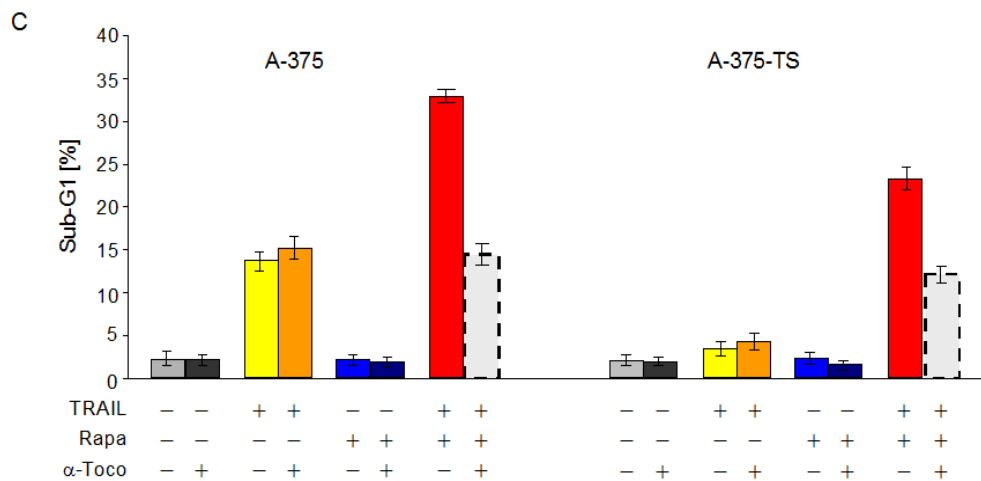


Abbildung 54: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und Produktion von ROS

(A) A-375 und A-375-TS Zellen wurden für 24 h mit 20 ng/ml TRAIL +/- 80 nM Rapamycin behandelt, mit TMRM⁺ gefärbt und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ durchflusszytometrisch bestimmt. Ein Verlust von $\Delta\psi_m$ korrespondiert mit einer Linksverschiebung. (B) A-375 und A-375-TS Zellen wurden ebenfalls für 24 h sowohl mit 20 ng/ml TRAIL +/- 80 nM Rapamycin behandelt als auch in Kombination mit 200 μ M α -Tocopherol für 1 h vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend mit H₂DCFDA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Behandelte Zellen (offene Graphen) wurden mit DMSO-behandelten Kontrollen (graue, gefüllte Graphen) verglichen. Eine höhere Fluoreszenz (Shift nach rechts) korrespondiert mit erhöhten ROS-Leveln. (C) Zeigt die Apoptoseinduktion, gemessen als Prozentsatz der sub-G1-Zellen, in A-375 und A-375-TS-Zellen nach Behandlung mit TRAIL/Rapamycin und nach Vorbehandlung mit α -Tocopherol (200 μ M, 1 h Vorinkubation). Die Zellzyklusanalyse wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt. Mittelwerte \pm SDs von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf den Vergleich von dreifach behandelten Zellen (Rapamycin/TRAIL/ α -Tocopherol) zu den Rapamycin/TRAIL-behandelten Zellen. (A, B) Drei unabhängige Experimente, jedes Experiment mit Triplikaten durchgeführt, zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Rolle von Bcl-2 in der Rapamycin-verstärkten TRAIL-induzierten Apoptose

Obwohl Veränderungen auf der Expressionsebene der Bcl-2 Proteine nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 53C), wurde mit dem nachfolgenden Experiment die maßgebliche Rolle von Bcl-2 in der Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose untersucht und aufgezeigt. Die Behandlung von A-375 Zellen mit einem stabil transfizierten Bcl-2-Überexpressionsplamid (A-375-Bcl-2) und einem Kontrollplasmid (A-375-pIRES) mit Rapamycin und TRAIL führte in dem sensitiven pIRES-Klon zu einer Apoptoseinduktion zwischen 22% nach 80 nM Rapamycin/TRAIL und 26% nach 160 nM Rapamycin/TRAIL. Der stabil transfizierte A-375-Bcl-2-Zellklon dagegen blockierte die durch Rapamycin/TRAIL-induzierte Apoptose nahezu vollständig (Abb. 55A).

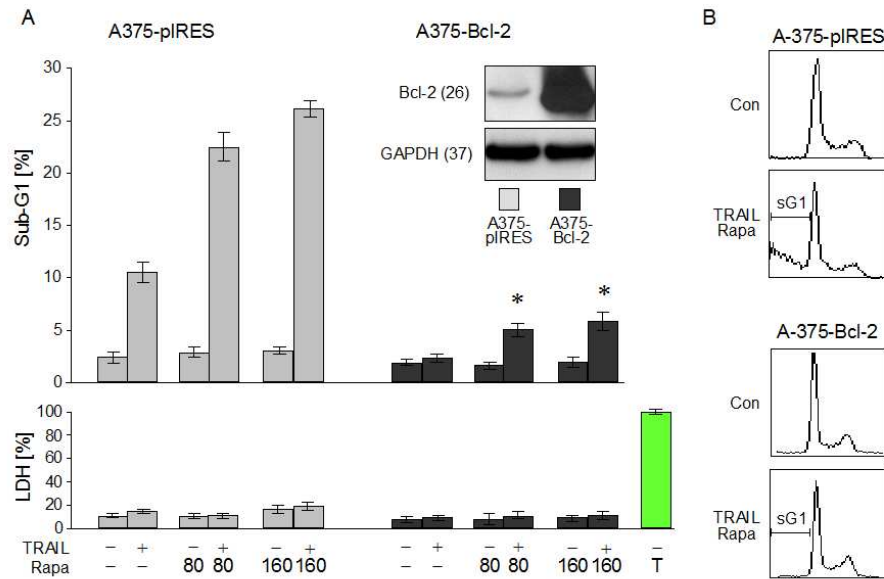


Abbildung 55: Die Rolle von Bcl-2 in der Rapamycin-verstärkten Apoptose.

(A) In Zellzyklusanalysen wurde die Apoptoseinduktion (sub-G1-Zellen in %) in stabil transfizierten A-375-Klonen (A-375-pIRES und A-375-Bcl-2) nach Behandlung mit Rapamycin (80, 160 nM) +/- TRAIL untersucht. Parallel dazu wurde die Zytotoxizität mit einem Assay zur Bestimmung der freigesetzten LDH-Menge bestimmt. Mittelwerte \pm SDs von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind gezeigt. Statistisch signifikante Werte sind mit * ($p < 0,005$) gekennzeichnet und beziehen sich auf den Vergleich von Rapamycin/TRAIL behandelten Zellen im Kontrollklon A-375-pIRES zu Rapamycin/TRAIL-behandelten Zellen im Bcl-2 überexprimierenden Klon. (B) Histogramme von A-375-pIRES und A-375-Bcl-2 zeigen die Apoptoseinduktion nach Rapamycin/TRAIL-Behandlung (Histogramm 2 und 4) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen (Histogramm 1 und 3). Sub-G1 Populationen sind mit sG1 gekennzeichnet.

Bax ist von essenzieller Bedeutung für die Rapamycin -verstärkte Apoptose

Die Rolle von Bax und Bak wurden in einem HCT-116 Kolonkarzinommodell untersucht, welches schon ausführlich in den anderen Projekten beschrieben wurde. Die Behandlung mit Rapamycin +/- TRAIL für 24 h führte zu einer Apoptoseinduktion von etwa 40% in den parentalen Wildtyp-Zellen (Bax^+/Bak^+ ; Abb. 56, Block 1). Die Bak-defizienten Zellen (Bax^+/Bak^-) zeigten nach Kombinationsbehandlung eine Apoptoseinduktion von etwa 35% (Abb. 56, Block 2), was einen Hinweis darauf lieferte, dass die Bak-vermittelte Apoptose in diesem Fall keine Rolle zu spielen scheint. In den Bax-defizienten Zellen (Bax^-/Bak^+) konnte nach Behandlung mit TRAIL und mit der Kombination aus Rapamycin und TRAIL keine signifikante Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Abb. 56, Block 3). Die doppelt-defizienten Zellen (Bax^-/Bak^-) erwiesen sich ebenso wie die Bax-defizienten Zellen als quasi apoptoseresistent mit einer Apoptoseinduktion von unter 5% (Abb. 56, Block 4).

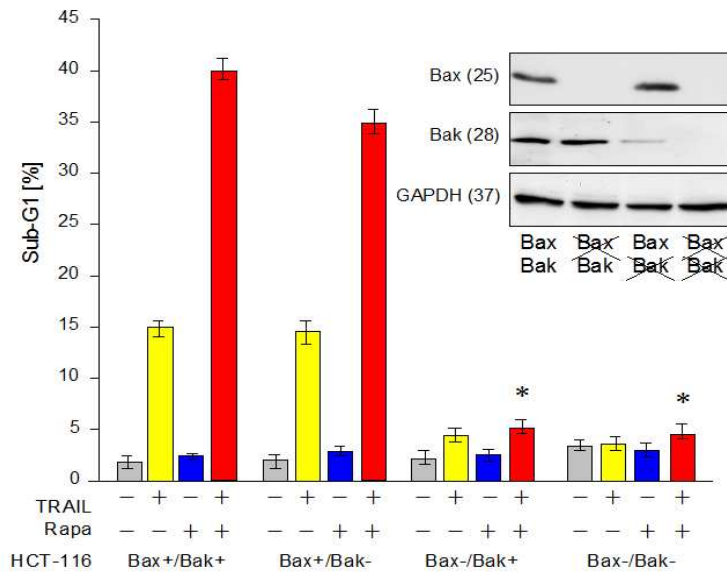


Abbildung 56: Bax in der Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose.

Die Induktion der Apoptose (Prozentsatz der sub-G1-Zellpopulation) wurde in einem HCT-116-Kolonkarzinom Zellkulturmodell 24 h nach Behandlung mit Rapamycin +/- TRAIL untersucht. Das HCT-Zellkulturmodell bestehend aus den parentalen Zellen (Bax⁺/Bak⁺) und drei Subklonen mit einer Defizienz für Bax und/oder Bak (Bax⁻/Bak⁺; Bax⁺/Bak⁻; Bax⁻/Bak⁻) wurde durchflusszytometrisch nach Propidiumjodidfärbung untersucht. Die statistisch signifikante Reduktion der Apoptose (*; p<0,005) in den Subklonen ist gekennzeichnet und bezieht sich auf den Vergleich von Rapamycin/TRAIL-behandelten Zellen in den Bax-defizienten und doppelt-defizienten Zellen zu den Rapamycin/TRAIL-behandelten parentalen Kontrollzellen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente untersucht, die jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt wurden. Diese ergaben in hohem Maße vergleichbare Ergebnisse. Einschub: Die Expression bzw. der Knockdown von Bax und Bak wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft, wobei GAPDH als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente.

Rapamycin hat einen Einfluss auf die Bax-Phosphorylierung

Um die Bedeutung der Bax-Abhängigkeit für die Rapamycin-verstärkte Apoptose zu klären, wurde der Phosphorylierungsstatus von Bax analysiert. Untersucht wurden die inaktivierende Phosphorylierungsstelle von Bax (pBax-Ser-184) und die aktivierende Phosphorylierungsstelle von Bax (pBax-Thr-167). Der Phosphorylierungsstatus von Bax wurde, nach Permeabilisierung und Färbung der Zellen mit phosphospezifischen Antikörpern, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Verlässlichkeit der verwendeten Phospho-Antikörper wurde in dem HCT-116 Kolonkarzinommodell mit den parentalen und doppelt-defizienten Zellen getestet, um so unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen (Abb. 57A). Die Behandlung von A-375 und A-375-TS mit Rapamycin führte nach 2 h zu einer Aktivierung von Bax, gezeigt mit Hilfe eines N-terminalen aktivierungsspezifischen Antikörpers (Abb. 57B). Auch für den Phosphorylierungsstatus von Bax konnten bedeutende Veränderungen nach 2 h Rapamycin-Behandlung nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der deaktivierenden Serin-184 Stelle war vermindert (Abb. 57C), während die Phosphorylierung der aktivierenden Threonin-167 Stelle deutlich verstärkt war (Abb. 57D).

Dies verdeutlicht die Annahme, dass die Blockierung des PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweges, sei es durch Wortmannin oder Rapamycin, selbst keine Apoptose in Melanomzellen induzieren kann, jedoch zu einer Neuprogrammierung der Melanomzellen in Bezug auf die Apoptosesensitivität führt. Der Phosphorylierungsstatus von Bax scheint für diese erhöhte Apoptosesensitivität eine essenzielle Rolle zu spielen.

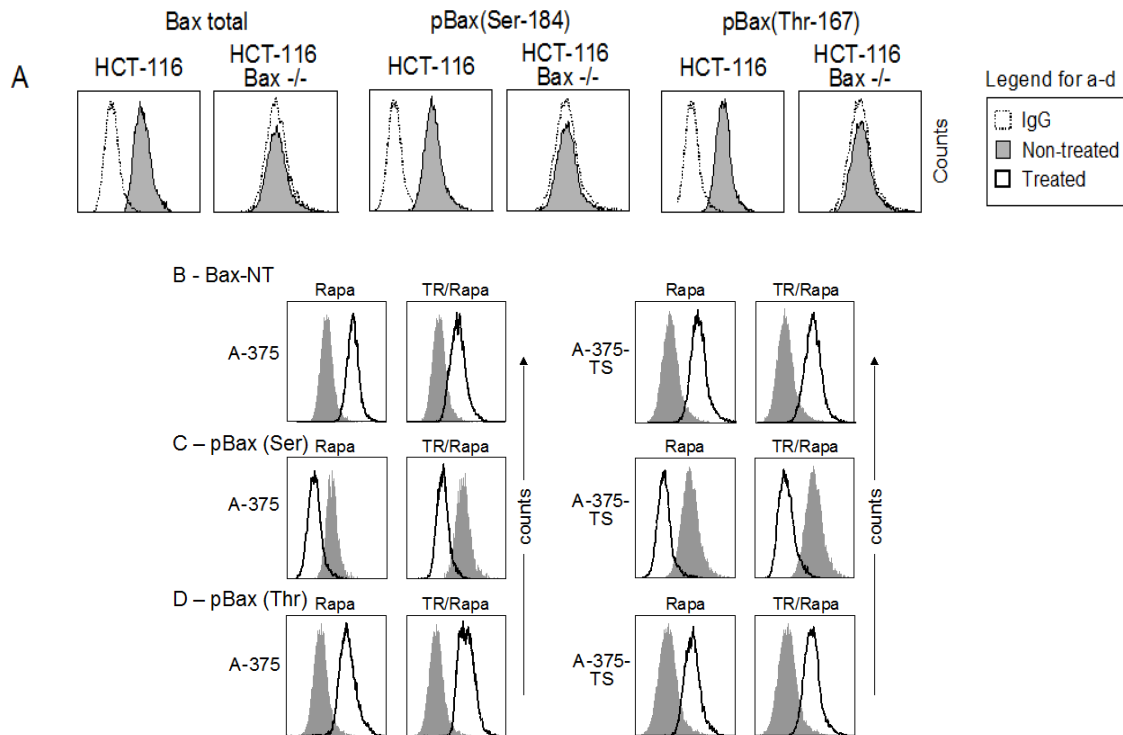


Abbildung 57: Rapamycin beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von Bax.

(A) Die Funktionalität der Bax-Antikörper wurde durchflusszytometrisch für parentale HCT-116 Zellen (Bax⁺/Bak⁺) und Bax-defiziente Zellen (Bax⁻/Bak⁺) untersucht. Dafür wurden Antikörper gegen Bax (Gesamtprotein) und phosphospezifische Antikörper gegen Bax (p-Bax Serin-184 und p-Bax Threonin-167) verwendet. Drei unabhängige Experimente wiesen in hohem Maße vergleichbare Ergebnisse auf. Unbehandelte Zellen (graue Graphen) wurden als Overlay mit IgG1-gefärbten Kontrollen (offene, gestrichelte Graphen) gezeigt. (B-D) A-375 und A-375-TS Zellen wurden für 2 h mit Rapamycin (80 nM) und Rapamycin +/-TRAIL behandelt. Für die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit den spezifischen Antikörpern für die aktivierende Konformationsänderung (Bax-NT; B), für p-Bax (Ser-184)(C) und für p-Bax (Thr-167)(D) gefärbt. Die behandelten Zellen (offene Graphen) sind als Overlay mit den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) und den IgG1-gefärbten Kontrollen (gestrichelte Graphen) dargestellt. Zwei vollständige und unabhängige Experimente, die jeweils mit Triplikaten durchgeführt wurden, wurden gemessen und ergaben übereinstimmende Ergebnisse.

Diskussion

Strategie I - Sensitivierung durch den Kaliumkanalinhibitor TRAM-34

Die Bedeutung von TRAIL für das Melanom

Der Todesligand TRAIL stellt eine vielversprechende Anti-Tumorstrategie dar, da TRAIL in einer Vielzahl von Krebszellen Apoptose induziert, während normale Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben (Ashkenazi, 2002; Wang und El Deiry, 2003; Di Pietro und Zauli, 2004; Wang, 2010). In *in vivo*-Untersuchungen an Mäusen und Primaten konnte eine Suppression des Tumorwachstums nach Behandlung mit TRAIL als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika gezeigt werden (Labrinidis et al., 2009; Wang et al., 2010b). Trotz dieser Erfolge weisen TRAIL und TRAIL-Rezeptor-Agonisten in klinischen Studien nur eine sehr beschränkte Effizienz auf, was in klinischen Studien von soliden Tumoren und Lymphomen gezeigt werden konnte (Herbst et al., 2010a; Younes et al., 2010; Soria et al., 2011). Diese beschränkte Wirksamkeit von TRAIL kann vor allem durch eine induzierbare Resistenz hervorgerufen werden, wie an einem Beispiel eines Brustkrebs-Tumormodells gezeigt werden konnte (Zhang und Zhang, 2008). In Melanomzellen wurde bereits früher von einer bestehenden TRAIL-Resistenz und einer induzierbaren Resistenz in Folge einer kontinuierlichen Behandlung mit TRAIL berichtet. Diese Resistenz war mit der Herabregulation der agonistischen TRAIL-Rezeptoren, des proapoptischen Bcl-2-Proteins Bid und der Initiatorcaspasen-8 und -10 verbunden (Kurbanov et al., 2005; Kurbanov et al., 2007). Auch hier konnte eine Herabregulation der TRAIL-Rezeptoren sowohl auf Ebene der Protein- als auch der Oberflächenexpression gezeigt werden. Da diese Effekte schon nach 8 h TRAIL-Behandlung in A-375 auftraten, schienen sie sowohl direkte als auch sehr frühe Effekte zu sein. Dieses Resultat wirft ein neues Licht auf die TRAIL-Resistenz in Melanomzelllinien. Die TRAIL-Behandlung von Melanomzelllinien induziert eine schnell auftretende TRAIL-Resistenz. Die Inhibition der vollständigen Caspase-3-Prozessierung konnte als ein weiteres Anzeichen für eine TRAIL-Resistenz im Melanom genommen werden. Die Effektorcaspase-3 wird als Proenzym exprimiert, welches in einem ersten Schritt zu einer intermediären 20 kDa-Form prozessiert wird. Es wird vermutet, dass die finale Prozessierung durch Autokatalyse stattfindet, die zu einer 17 kDa und 15 kDa-Form führt (Roy et al., 2001). Die Caspasenkaskade war in den parentalen A-375 Melanomzellen nach TRAIL-Behandlung deutlich sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigten die TRAIL-selektierten A-375 nach TRAIL-Behandlung weder ein 17 kDa noch ein 15 kDa Spaltprodukt, jedoch ein hohes Maß an intermediärem Spaltprodukt und eine effiziente Prozessierung der Caspase-8. Folglich sind die resistenten Melanomzellen durch eine Blockade der autokatalytischen Caspase-3-Aktivität

charakterisiert, was eventuell auf eine ungenügende Aktivierung der Caspasenkaskade zurückzuführen ist. Die Überwindung dieser TRAIL-Resistenz repräsentiert somit einen kritischen Schritt zur Etablierung einer TRAIL-basierten Therapie. Mehrere Behandlungsweisen zur Sensitivierung von Melanomzellen für TRAIL wurden bereits untersucht (Jiang et al., 2007; Ivanov et al., 2008; Hornle et al., 2010; Berger et al., 2010; Berger et al., 2013). Im Folgenden werden verschiedene Strategien zur Überwindung der TRAIL-Resistenz näher diskutiert.

Effekte des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34

In dieser Arbeit wurde eine völlig neue Strategie zur Sensitivierung präsentiert, die auf der selektiven Inhibition des Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanals KCa3.1 (IK1) basiert. Eine verstärkte Expression von KCa3.1 wurde in diversen Tumorentitäten berichtet (Schonherr, 2005; Chou et al., 2008; Lee et al., 2008) und auch in Melanomzellen wurden KCa3.1-abhängige Transmembran-Kaliumströme gemessen (Gavrilova-Ruch et al., 2002). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit die Expression von KCa3.1 auf mRNA- und Proteinebene in einer Reihe von Melanomzelllinien nachgewiesen werden, was zu der Annahme veranlasste, dass die Expression von KCa3.1 ein charakteristisches Merkmal des Melanoms ist. KCa3.1-Kanäle können durch verschiedene Inhibitoren wie Clotrimazol, das Skorpiongift Charybdotoxin und TRAM-34 blockiert werden, die höchste Selektivität weist aber das Clotrimazol-Analogon TRAM-34 auf. TRAM-34 führt nicht wie Clotrimazol zu einer Inhibition der Cytochrom-P450-Enzyme und zeigt dadurch auch nicht die Begleiterscheinungen einer Leberzytotoxizität (Wulff et al., 2000). Die Spezifität der TRAM-34-vermittelten Effekte wurden in KCa3.1-negativen HEK-293 Zellen untersucht, die nicht auf eine Behandlung mit TRAM-34 ansprechen. Die Expression von KCa3.1 in HEK-293 Zellen durch transiente Transfektion führte zu einer deutlichen Ansprechbarkeit der Zellen. KCa3.1-Kanäle wurden mit anormaler Tumor-Zellproliferation und Migration (Schwab et al., 1999; Wickenden, 2002; Schmidt et al., 2010; Schwab et al., 2012) in Verbindung gebracht und antiproliferative Effekte nach KCa3.1-Inhibition wurden in verschiedenen Tumorzellen berichtet (Chou et al., 2008). In Übereinstimmung mit diesen Berichten konnte eine signifikante Inhibition des Zellwachstums von Melanomzellen durch die Behandlung mit TRAM-34 gezeigt werden.

Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch TRAM-34

Bis dato gab es keine Daten, die Apoptoseinduktion mit einer Inhibition des KCa_{3.1}-Kanals in Verbindung gebracht haben. Vielmehr wurde berichtet, dass Calcimycin-induzierte Apoptose in Lymphozyten sowohl durch Charybdotoxin als auch durch Clotrimazol supprimiert wurde (Elliott und Higgins, 2003) und dass TRAM-34 die proapoptotischen Effekte von Cisplatin in Plattenepithelkarzinomen inhibiert (Lee et al., 2008). Die Kombination von Todesliganden mit Kaliumkanal-Inhibitoren wurde bis jetzt noch nicht in Erwägung gezogen, zeigten sich aber als Erfolg versprechend in Melanomzellen, da TRAM-34 selbst keine Apoptose induziert. Die Kombination von TRAM-34 und TRAIL führte zu einer synergistisch verstärkten Apoptose und war in der Lage sowohl präexistente als auch induzierbare TRAIL-Resistenzen zu überwinden. Interessanterweise reagierten alle neun untersuchten Melanomzelllinien, was einen allgemeingültigen Mechanismus für die Sensitivierung durch TRAM-34 annehmen lässt. Aufgrund dieser Daten erscheint die Verbindung zwischen Kaliumkanälen und Apoptose in einem neuen Licht.

Mechanismen der TRAM-34-vermittelten TRAIL-Sensitivierung

Hinsichtlich des Mechanismus, wie TRAM-34 die TRAIL-induzierte Apoptose verstärkt, konnte eine Hochregulation beider agonistischer TRAIL-Rezeptoren gezeigt werden. Dies schien von besonderem Interesse zu sein, da die Herabregulation der TRAIL-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der induzierbaren TRAIL-Resistenz von Melanomzellen (Kurbanov et al., 2007) spielt, was durch TRAM-34 verhindert wurde. Eine Hochregulation der TRAIL-Rezeptoren konnte ebenso nach Behandlung mit Resveratrol und Indirubin (Ivanov et al., 2008; Berger et al., 2010) detektiert werden. Die TRAIL-Decoyrezeptoren DcR1 und DcR2 schienen dagegen keine Rolle in der TRAM-34/TRAIL-induzierten Apoptose zu spielen. Trotz der hochregulierten agonistischen TRAIL-Rezeptoren war die Prozessierung der Initiatorcaspase-8 nach Behandlung mit TRAM-34/TRAIL, im Vergleich zu der TRAIL-Monobehandlung, bemerkenswerterweise nicht signifikant verstärkt. Dies spricht eindeutig für eine ausschlaggebende Rolle von nachgeschalteten Regulationsschritten. In der Tat konnte eine maßgebliche Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges, durch ein vermindertes mitochondriales Membranpotential und die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren Cytochrom C, AIF und SMAC aus den Mitochondrien, gezeigt werden. Diese mitochondriale Aktivierung scheint für die TRAM-34/TRAIL-induzierte Apoptose von essenzieller Bedeutung zu sein. Neben der Induktion der Apoptose durch TRAM-34/TRAIL konnte auch eine ausgeprägte Abhängigkeit von Proteinen der Bcl-2-Familie nachgewiesen werden. Der

Knockout von Bax, die Überexpression von Bcl-2 und die siRNS-vermittelte Herabregulation von Bid führten zu einer ausgeprägten Abnahme der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose. Die Relevanz des mitochondrialen Signalweges für die TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen wurde auch für Substanzen der chinesischen Medizin wie Wogonin und Indirubin (Fas et al., 2006; Berger et al., 2010) und für UVB-Strahlung (Hornle et al., 2010) gezeigt, was die Bedeutung des mitochondrialen Signalweges für die Apoptoseinduktion in Melanomzellen nur unterstreicht.

Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch TRAM-34

Wie also ist TRAM-34 in der Lage den mitochondrialen Signalweg zu aktivieren? Bis zum Jahr 2005 wurde angenommen, dass Kaliumkanäle in der Plasmamembran lokalisiert sind und für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials sorgen (Wickenden, 2002). Dann jedoch konnten Kaliumströme über die mitochondriale Membran nachgewiesen werden, die durch einen spannungsabhängigen Kaliumkanal (Kv1.3) in Lymphozyten gesteuert wurden (Szabo et al., 2005). Mittlerweile konnten Patch-Clamp Analysen von Mitoplasten (aufgeblähten Mitochondrien) aus Kolonkarzinom-Zellen auch mitochondriale KCa3.1-Aktivität nachweisen (Sassi et al., 2010). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis, wurde hier eine signifikante Expression von KCa3.1 in der mitochondrialen Fraktion von Melanomzellen gezeigt. Die Hyperpolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) nach Behandlung mit TRAM-34 zeigte deutlich die mitochondriale Aktivität der KCa3.1-Kanäle. Die Abhängigkeit dieses Effektes von KCa3.1 wurde in KCa3.1-negativen HEK-Zellen überprüft und belegt. KCa3.1-negative HEK-293 Zellen zeigten keine Veränderungen des $\Delta\psi_m$ nach TRAM-34 Behandlung, aber eine wiederhergestellte Hyperpolarisierung nach KCa3.1-Transfektion. Hyperpolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials wurde als vorausgehender Schritt der Apoptose auch nach Kv1.3-Inhibition gezeigt (Szabo et al., 2008), was vermuten lässt, dass dies ein charakteristischer und essenzieller Schritt in der Kaliumkanal-vermittelten Apoptose ist. Der hyperpolarisierende Effekt könnte durch den Einstrom von mitochondrialem Kalium, der dem erhöhten $\Delta\psi_m$ durch Export von Protonen entgegenwirkt, verursacht werden (Garlid und Paucek, 2003).

Der Zusammenhang zwischen Kaliumkanälen und deren möglicher Apoptoseregulation wurde von der Gruppe um Szabò untersucht, die eine Interaktion zwischen Bax und dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 in Lymphozyten nachweisen konnten. Diese Interaktion erwies sich als notwendig für die Bax-induzierte Apoptose in Lymphozyten (Szabo et al., 2008). Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützten die bedeutende Rolle von Bax für die Apoptoseregulation in Melanomzellen. Und obwohl eine eindeutige Interaktion zwischen

KCa3.1 und Bax nicht zweifelsfrei in den Immunpräzipitationsanalysen gezeigt werden konnte, so konnte doch eine klare Abhängigkeit der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose von Bax gezeigt werden. Zusätzlich konnte die mitochondriale Translokation von Bax nach TRAM-Behandlung als frühes Ereignis nachgewiesen werden.

Die Bedeutung des SMAC-cIAP-Gleichgewichts für die Sensitivierung

Bei der Untersuchung der freigesetzten mitochondrialen Faktoren im Zuge der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose, stellte sich AIF als eher unwichtig heraus, da AIF einen Caspase-unabhängigen Zelltod vermittelt (Norberg et al., 2010). Die hier gezeigte TRAM/TRAIL-induzierte Apoptose war jedoch ein Caspase-abhängiger Prozess, wie die Blockierung der Apoptose mittels Caspaseinhibitoren zeigte. Cytochrome C, welches nach Freisetzung aus den Mitochondrien die Initiatorcaspase-9 aktiviert (Huttemann et al., 2011) könnte zur Sensitivierung von A-375 und A-375-TS beitragen. Als wahrscheinlichster Kandidat für die verstärkte Apoptose durch TRAM-34 präsentierte sich aber das Gleichgewicht zwischen den antiapoptotischen zellulären IAPs und dem aus den Mitochondrien freigesetzten SMAC. In einer Vielzahl von Tumorzellen sind die Proteine der IAP-Familie häufig überexprimiert und tragen zu Tumorwachstum, Pathogenese und Chemoresistenz bei (Fulda und Vucic, 2012). Um den Zelltod zu verhindern kann XIAP direkt an die prozessierte Caspase-9 und -3 binden (Vogler et al., 2009). Die vorliegenden Daten zeigten auch für Melanomzellen eine signifikante Expression von zellulären IAPs, was zu der Annahme führte, dass ein hohes Maß an XIAP als Bremse fungierte, die die vollständige Prozessierung der Caspase-3 nach Behandlung mit TRAIL verhinderte. Die daraus resultierende Hypothese basierte auf einer Neutralisierung von XIAP und einer vermehrten Caspase-3-Aktivität durch das nach TRAM/TRAIL-Behandlung freigesetzte SMAC. Belegt wurde diese Hypothese mit der siRNS-vermittelten Herabregulation von SMAC, die zu einer vollständigen Blockierung der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose in den TRAIL-resistenten A-375-TS Zellen führte. Die verbleibende Apoptose in den parentalen A-375 Zellen wird wahrscheinlich über die direkte Caspasenkaskade reguliert. Die bedeutende Rolle des SMAC/XIAP-Gleichgewichts wurde auch in anderen Studien untersucht und führte zu der Entwicklung von niedermolekularen XIAP-Inhibitoren, die zu einer Verstärkung der TRAIL-Sensitivität beitragen konnten (Zhang et al., 2001; Vogler et al., 2009). Die entscheidende Rolle des SMAC-cIAP-Gleichgewichts für die TRAM-34/TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzellen konnte auch durch die Überexpression von XIAP gezeigt werden, die zu einer Reduzierung der Apoptose um 50% führte. Die besondere Funktion von TRAM-34 in diesem Setting bestand in der Öffnung des mitochondrialen Signalweges durch die Aktivierung von Bax.

In Hinsicht auf die Entwicklung effektiver Therapien für das Melanom sollte man künftig TRAM-34 und TRAIL mit berücksichtigen. Da sowohl TRAIL als auch andere Clotrimazol-Analoga, mit nur sehr geringen und vernachlässigbaren Nebenwirkungen, in klinischen Studien angewandt wurden (Ataga und Stocker, 2009; Herbst et al., 2010a), spräche nichts gegen eine Anwendung in Studien mit Melanompatienten, denn die Kombination aus TRAM-34 und TRAIL hat sich *in vitro* als ausgesprochen effektiv erwiesen.

Strategie II - Sensitivierung durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin

Aufgrund der hier vorliegenden Daten wurde ein neuer Signalweg hypothetisiert, der auf der ROS-vermittelten Bax-Aktivierung beruht und die Sensitivierung von Melanomzellen für TRAIL durch die Behandlung mit Wortmannin erklärt (Abb. 50). Der inhibitorische Effekt von Wortmannin auf die PI3-Kinase wurde in zahlreichen Studien gründlich untersucht und resultierte in der Unterdrückung des Akt/PKB-Überlebenssignalweges (Lemke et al., 1999; Ayril-Kaloustian et al., 2010). Und auch die Rolle, die Akt/PKB in den TRAIL-Resistenzmechanismen spielt, wurde in verschiedenen Tumorzellmodellen untersucht (Chen et al., 2001; Kandasamy und Srivastava, 2002), unter anderem auch in Melanomzellen (Hersey und Zhang, 2003).

Die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin-473 und Threonin-308 repräsentierte die Aktivität der PI3-Kinase (Bozulic und Hemmings, 2009) und zeigte einen offenen und aktivierten Signalweg. Somit konnte, durch Herabregulation beider Akt/PKB-Phosphorylierungsstellen nach Behandlung mit Wortmannin, die Spezifität von Wortmannin in Melanomzellen gezeigt werden.

Effekte von ROS und des Akt/PKB-Signalweges auf die Apoptose

Die Verbindung zwischen dem Akt/PKB-Signalweg und der Apoptose beruhen auf der Phosphorylierung von Bad und von Bax an Serin-184 durch Akt/PKB. Beide Phosphorylierungen führen zu einer Inhibition der Aktivitäten von Bad (Sen et al., 2003) und Bax (Xin und Deng, 2006; Renault und Manon, 2011). In der Tat konnte eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung von Bax an Serin-184 nach Behandlung mit Wortmannin, mit Hilfe eines neuen Phosphorylierungs-Assays, gezeigt werden. Diese Dephosphorylierung reflektiert aber nur einen Teil des Signalweges, der zu einer Aktivierung von Bax führt.

Unzählige nachgeschaltete Signalwege wurden für Akt/PKB beschrieben (Dillon und Muller, 2010), die auch die Regulation einer NADPH Oxidasen, nämlich NOX4, beinhaltet. In

Pankreas-Karzinomzellen und chronisch myeloischen Leukämiezellen konnte eine verstärkte NOX4-Aktivität nach Inhibition von Akt/PKB gezeigt werden (Mochizuki et al., 2006; Naughton et al., 2009). Die von den NADPH-Oxidase katalysierte Reaktion sorgt für die Produktion großer Mengen Superoxide und steht daher in enger Verbindung mit den zellulären ROS-Signalwegen (Bedard et al., 2007; Serrander et al., 2007; Bedard und Krause, 2007). Eine erste Bestätigung, dass der von uns hypothetisierte Signalweg (Abb. 50) über NOX4 laufen könnte, lieferte die Bestimmung der ROS-Level in Melanomzellen nach Wortmannin-Behandlung. Nach Behandlung konnte ein vermehrter Anstieg der ROS-Level verzeichnet werden und die durch Wortmannin angeregte ROS-Produktion konnte nach 1 h gezeigt werden. Diese Reaktion ist damit ein frühes Ereignis und unterscheidet diesen Effekt von jedem sekundärem Effekt, der im Zuge der Apoptose auftreten kann. Das reaktive Sauerstoffradikale eine entscheidende Rolle in der Apoptoseinduktion spielen können, wurde unter anderem für Melanomzellen publiziert (Franke et al., 2010). Die Signifikanz von ROS für die Wortmannin/TRAIL-induzierte Apoptose konnte mit dem Radikalfänger und Antioxidant α -Tocopherol (Vitamin E) gezeigt werden.

ROS reguliert die Phosphorylierung von Bax an Threonin-167

Der Weg, wie ROS zur Induktion der Apoptose beitragen könnten, wurde nach Analyse der Bax-Phosphorylierungsstellen ersichtlich. Im Gegensatz zu der verminderten Bax-Phosphorylierung an Serin-184, was auf die Aktivität von Akt/PKB zurückzuführen ist, konnte eine Verstärkung der Bax-Phosphorylierung an Threonin-167 durch Wortmannin, also durch Inhibition des PI3K-Akt/PKB-Signalweges, aufgezeigt werden. Die Phosphorylierung von Bax an Threonin-167 wurde als Bax-aktivierender Schritt charakterisiert und stand in Staurosporin-behandelten Hepatom- und Chemotherapie-behandelten Retinoblastom-Zellen mit der Aktivierung des JNK- und p38-MAPK-Signalweges in Verbindung (Kim et al., 2006a; Shen et al., 2009; Min et al., 2012). Während sich die Dephosphorylierung von Bax an Serin-184 als völlig unabhängig von ROS erwiesen hat, konnte die Behandlung mit α -Tocopherol die Phosphorylierung der Threonin-167 Stelle von Bax nahezu vollständig blockieren, was auf einen deutlichen Bezug zu ROS hinweist. Bis dato basierten die Verbindungen zwischen ROS und Bcl-2-Proteinen auf der Regulation der Expressionslevel. In Plattenepithelkarzinomen konnte eine Verbindung zwischen der Herabregulation von Bcl-2 und Bcl-x_L und der Hochregulation von Bax und Bak parallel zu intrazellulären ROS-Level gezeigt werden (Li et al., 2004). Die hier aufgezeigte Verbindung zwischen ROS und Bax-Phosphorylierung kann einen frühen Effekt von ROS auf die Apoptose-Sensitivität erklären.

Eine Vielzahl von Kinasen könnte an den Regulationsmechanismen der Bax-Phosphorylierung an Threonin-167 involviert sein, denn die Aktivierung von ASK-1, JNK, p38-MAPK, ERK1/2, PKC und CDKs durch ROS wurde bereits berichtet (Li et al., 2004; Verbon et al., 2012). Der hier gezeigte Bax-Aktivierungs-Assay deutet zudem darauf hin, dass die Aktivität von Bax unabhängig durch seine beiden Phosphorylierungsstellen kontrolliert wird, da die Behandlung mit α -Tocopherol zwar die Bax-Threonin-167 Phosphorylierung verhinderte, die Bax-Aktivierung durch Wortmannin und die Apoptoseinduktion durch Wortmannin/TRAIL aber nur teilweise blockieren konnte.

Bax selbst nimmt eine Schlüsselstellung in der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalweges ein und dessen besondere Rolle in der TRAIL-induzierten Apoptose wurde kürzlich aufgeklärt (Gillissen et al., 2010; Chipuk et al., 2010). Auch in der TRAIL/Wortmannin-vermittelten Apoptose konnte eine Abhängigkeit von Bax aufgezeigt werden, wohingegen Bak in diesem Setting keine Rolle zu spielen scheint. Die Kontrolle der Bak-Aktivität in Melanomzellen wurde als abhängig von VDAC2-kontrollierten Signalwegen beschrieben (Plötz et al., 2012).

Aktivierung des mitochondrialen Signalweges

Bcl-2 repräsentiert einen wichtigen antiapoptotischen Faktor im Melanom (Jansen et al., 2000; Eberle et al., 2007b). Das Modell der wechselseitigen Regulation der Bcl-2-Proteine durch Heterodimerisierung, bei dem Bcl-2 als spezieller Antagonist von Bax fungiert (Tait und Green, 2010b), könnte das stark antiapoptotische Potenzial von Bcl-2 in dem vorgestellten Ansatz erklären. Daher sorgt die Überexpression von Bcl-2 für eine vollständige Blockierung der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose.

Eine zusätzliche Erklärung für den Effekt der synergistischen Verstärkung der Apoptose durch Wortmannin und TRAIL lieferte das proapoptotische Bcl-2-Protein Bid, welches durch die Initiatorcaspase-8 gespalten und aktiviert wird (Kaufmann et al., 2012). Die Rolle von Bid und dessen Aktivierung durch TRAIL in TRAIL-sensitiven und TRAIL-resistenten Melanomzellen wurde schon zuvor beschrieben und die Herabregulation von Bid verhinderte die TRAIL-induzierte Apoptose in Kombination mit Substanzen wie dem CDK-Inhibitor Indirubin (Berger et al., 2010) und TRAM-34 (Quast et al., 2012). Das aktivierte Bid (truncated Bid) wirkt dabei als effizienter Antagonist von Bcl-2 (Song et al., 2010; Chipuk et al., 2010).

Damit ergibt sich folgendes Bild: Die basalen Level von Bcl-2 in Melanomzellen scheinen auszureichen, um die Apoptose, die von Wortmannin induziert wird, zu blockieren. Und das, obwohl Bax durch Wortmannin aktiviert wird. Auf der anderen Seite wird eine effiziente Apoptoseinduktion durch TRAIL durch inaktiviertes Bax verhindert. Der Durchbruch in der

Kombinationsbehandlung resultiert also aus der Bax-Aktivierung durch Wortmannin und der simultanen Bcl-2-Inaktivierung durch TRAIL-induzierte Spaltung von Bid zu tBid (Abb. 50).

Nachgeschaltete Signalwege in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose

Die nachgeschalteten Signalwege in der TRAIL/Wortmannin-induzierten Apoptose beinhalteten die signifikante Freisetzung von apoptogenen, mitochondrialen Faktoren (Cytochrom C, SMAC, AIF). Der gut charakterisierte Signalweg über Cytochrom C und SMAC läuft über die Aktivierung der Caspasen (Tait und Green, 2010b), was in diesem Ansatz aber nicht gezeigt werden konnte. Auch unter anderen Behandlungsbedingungen, etwa bei Apoptoseinduktion durch das Nukleosid-Analogon N69, konnte keine Caspasenaktivierung in Melanomzellen nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde Apoptose über ROS-abhängige Signalwege induziert (Franke et al., 2010). Die Blockierung der vollständigen Caspaseprozessierung und damit ihre Aktivierung kann mit der inhibitorischen Aktivität der reaktiven Sauerstoffradikale erklärt werden. ROS-vermittelte Thiol-Oxidation kann zu einer Oxidation von Cystein-Resten in dem katalytischen Zentrum der Caspasen führen und damit auch zu einer Blockierung der Caspasen-Aktivität und der Prozessierung der Procaspasen (Hampton et al., 1998a; Hampton et al., 1998b; Borutaite und Brown, 2001). Mit dieser Studie konnte ein effizienter Signalweg zur Apoptose-Induktion in Melanomzellen aufgezeigt werden, der zu DNS-Fragmentierung unabhängig von der Caspasenkaskade führte. Unter diesen Bedingungen führte die Freisetzung von Cytochrom C und SMAC in eine Sackgasse und beide mitochondrialen Faktoren trugen nicht direkt zur Apoptose bei. Dafür könnten aber proapoptotische Faktoren wie AIF und Endonuklease G, die ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt werden und eine Caspasen-unabhängige Apoptoseinduktion fördern, in den Vordergrund treten (Tait und Green, 2008; D'Anneo et al., 2012).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Apoptose-Resistenz in Melanomzellen auf mehreren Ebenen reguliert wird, die sowohl ein hohes Bcl-2-Level beinhalten (Jansen et al., 2000; Eberle et al., 2007b), als auch eine Inaktivierung von Bax durch seine Phosphorylierung/Dephosphorylierung, wie schon zuvor berichtet wurde (Berger et al., 2013).

Eine dritte Regulationsebene der TRAIL-Resistenz in Melanomzellen wurde erst kürzlich genauer untersucht und umfasst die hohe Expression von XIAP, was zu einer Blockierung der Caspasenkaskade und damit zu einer Blockierung der Apoptose führt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Blockade durch XIAP nur durch die Freisetzung von SMAC durchbrochen werden konnte (Hornle et al., 2010; Quast et al., 2012). In der Wortmannin-vermittelten Sensitivierung spielte die Inhibition der Caspasen durch XIAP aber keine entscheidende Rolle,

da die cIAPs über den ROS-abhängigen und Caspase-unabhängigen Signalweg umgangen wurden.

Der Todesligand TRAIL wurde als vielversprechende Antitumor-Strategie angesehen (Walczak et al., 1999; Ashkenazi, 2002), obwohl induzierbare Resistenzen in verschiedenen Tumormodellen, wie beispielsweise dem Melanom (Li et al., 2006; Kurbanov et al., 2007), nachgewiesen werden konnten. Induzierbare Resistenzen könnten aber durchaus der Grund für die begrenzte Wirksamkeit von TRAIL sein, die in klinischen Studien gezeigt wurde (Herbst et al., 2010a; Soria et al., 2011). Einen Lichtblick stellen die Veröffentlichungen der letzten Zeit dar, die in vielen verschiedenen Strategieansätzen eine effizientere Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose aufzeigen konnten (Jiang et al., 2007; Hornle et al., 2010; Berger et al., 2010; Ivanov und Hei, 2011; Quast et al., 2012; Berger et al., 2013).

Die Sensitivierung der Melanomzellen wurde in diesem Ansatz mit der Aktivierung von Bax erklärt, die aus den Veränderungen des Phosphorylierungsstatus in Abhängigkeit von Akt/PKB und ROS resultierte. Dieser neue Signalweg könnte von großer Bedeutung für andere proapoptische Strategien, sowohl im Melanom als auch in anderen Tumoren, sein.

Strategie III - Sensitivierung durch den mTOR-Kinaseinhibitor Rapamycin

Eine Fehlregulation von mTOR und ein konstitutiv aktiver PI3K-Akt/PKB/mTOR-Signalweg wurden in diversen Tumorentitäten berichtet, so auch im Melanom, und sind mit einer schlechten Prognose verbunden (Meier et al., 2005; Smalley et al., 2006; Marone et al., 2009; Pópulo et al., 2012; Xie et al., 2013; Dronca et al., 2013; Müller et al., 2013). Pharmakologische Inhibitoren der Komponenten dieses Signalweges haben sich daher als attraktives Ziel für die Behandlung des malignen Melanoms erwiesen. Unter den Inhibitoren, die mit dem PI3K-Signalweg interagieren, sind die mTOR-Inhibitoren in der klinischen Entwicklung am weitesten und haben ihre Wirksamkeit in Nierenkarzinom-, Pankreaskarzinom- und Brustkrebszellen bewiesen (Motzer et al., 2008; Yao et al., 2011a; Yao et al., 2011b; Xie et al., 2013)

Effekte von Rapamycin

Die Serin/Threonin-Kinase mTOR existiert in zwei Komplexen, dem Rapamycin-sensitiven Komplex mTORC1 und dem Rapamycin-insensitiven Komplex mTORC2 und beide Komplexe regulieren unterschiedliche Funktionen. So ist der mTORC1 für die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine zuständig, die Ribosomen-Biogenese,

Transkription, Proteinsynthese und den mitochondrialen Metabolismus regulieren. Der mTORC2 dagegen reguliert die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin-473 und damit die vollständige Aktivierung von Akt/PKB (Vijapurkar et al., 2012). Die Kinase mTOR kann durch diverse Rapamycin-Analoga, so genannte Rapaloga (z.B. Temsirolimus, Everolimus), blockiert werden. Rapamycin wurde von all diesen Substanzen am intensivsten untersucht, wurde und wird in vielen Bereichen angewandt und wurde Ende der 90iger Jahre als Immunsuppressivum, zur Verhinderung von Organabstoßungen nach Transplantationen, zugelassen. Aber auch für die anderen Rapaloga gibt es mittlerweile zahlreiche klinische Studien in diversen Tumorentitäten (Peramo und Marcelo, 2013; Dronca et al., 2013; Frost et al., 2013). Alle mTOR-Inhibitoren zeichnen sich durch ihre antiproliferativen Effekte und den Zellzyklusarrest in der G1-Phase aus, wie es für Lymphome, kleinzellige Lungenkarzinome, Rhabdomyosarkome, Melanome und Mammakarzinome beschrieben wurde (Carraway und Hidalgo, 2004; Lasithiotakis et al., 2008; Bundscherer et al., 2008; Peramo und Marcelo, 2013; Müller et al., 2013; Moad et al., 2013) und hier für die verschiedenen Melanomzelllinien gezeigt werden konnte. Neben der antiproliferativen Wirkung wurde speziell für Rapamycin und Temsirolimus (CCI-779) auch eine Autophagie-induzierende Wirkung nach Behandlung mit hohen Konzentrationen beschrieben. Induktion der Autophagie durch Rapamycin kann zu einem Überleben des Tumors und damit zu einer potenziellen Limitierung seiner Wirksamkeit führen (Xie et al., 2013). In Übereinstimmung mit diesem Bericht konnte eine signifikante Induktion der Autophagie in Melanomzellen nach Behandlung mit hohen Konzentrationen Rapamycin nachgewiesen werden.

Gegensätzliche Berichte gibt es allerdings zu der Regulation von Akt/PKB durch Rapamycin und die verschiedenen Rapaloga. In hämatologischen Tumoren führte die Behandlung mit Rapamycin zu einem Anstieg der Phospho-Akt Level, in Zervixkarzinomzellen dagegen zu einem verminderten Level von mTORC2 und damit auch zu einem verminderten Level der Akt-Serin-473-Phosphorylierung (Müller et al., 2013). Und obwohl der mTORC2 initial als nicht Rapamycin-empfindlich beschrieben wurde, haben Untersuchungen einen Einfluss von Rapamycin auf den mTORC2 in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen (Sarbasov et al., 2006; Dancy, 2010). In Anlehnung an diese Daten konnte eine leichte Herunterregulierung der Serin-473-Phosphorylierungsstelle von Akt/PKB nach Rapamycinbehandlung in Melanomzellen gezeigt werden.

TRAIL-Sensitiverung von Melanomzellen durch Rapamycin

Ebenfalls gegensätzliche Berichte gibt es zu der Apoptoseinduktion durch Rapamycin und andere Rapaloga. In Nierenzellkarzinomen, Astrozytomen und Pankreaskarzinomzellen konnte

keine apoptotische Antwort nach Inhibition von mTOR nachgewiesen werden, was mit der Inhibition der negativen Regulation (feedback) des Akt/PKB-Signalweges erklärt wurde (Vijapurkar et al., 2012). In hämatologischen Malignitäten wie Mantelzell-Lymphomen, Non-Hodgkin-Lymphomen sowie multiplen Myelomen wurde gezeigt, dass Rapamycin und Temsirolimus zu einer Apoptoseinduktion führten (Frost et al., 2013). Verschiedenen mTOR-Inhibitoren wurde eine additive oder synergistische Wirkung in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika wie Cisplatin und Paclitaxel nachgesagt (Pópulo et al., 2012). In Leukämiezellen führte die Behandlung mit der Kombination aus Rapamycin und einem Inhibitor der Checkpoint-Kinase 1 (Chk1) zur Herunterregulation von Bcl-2-Proteinen wie Mcl-1, Bcl-x_L und Bcl-2 sowie von wichtigen Zellzyklusregulatoren wie Zyklin D1 und Cdc2. Parallel dazu konnte eine Aktivierung des JNK-Signalweges nachgewiesen werden (Desai et al., 2002; Hahn et al., 2005; Panner et al., 2006). Für Melanomzellen wurde beschrieben, dass die Kombination von Rapamycin und Temozolomid (ein alkylierendes Zytostatikum) die Zellen für die Temozolomid-induzierte Apoptose sensitiviert. Ebenso wurden synergistische Effekte für die Kombination von Temsirolimus und DTIC oder Cisplatin beschrieben (Sinnberg et al., 2009; Dronca et al., 2013). Und auch Kombinationen von mTOR-Inhibitoren mit MAPK-Inhibitoren oder Celecoxib führten in Melanomzellen zu einer Apoptoseinduktion, zu inhibiertem Zellwachstum und zu einem Verlust der Invasivität (Bundscherer et al., 2008; Lasithiotakis et al., 2008). In Glioblastomzellen allerdings konnte Rapamycin weder für die TRAIL-induzierte noch die Doxorubicin-induzierte Apoptose sensitivieren (Opel et al., 2008). In Melanomzellen wurde die Kombination von Todesliganden wie TRAIL und Rapaloga bis jetzt noch nicht in Erwägung gezogen. Die Kombination von Rapamycin und TRAIL führte zu einer additiv verstärkten Apoptose in sensitiven und moderat-sensitiven Melanomzellen und war in der Lage induzierbare TRAIL-Resistenzen zu überwinden. Allerdings konnten präexistente Resistenzen durch diese Kombinationsbehandlung nicht überwunden werden. Dem liegt zu Grunde, dass Rapamycin selbst keine Apoptose induzieren kann und nur als Verstärker für die TRAIL-induzierte Apoptose fungiert, welches aber in diesen Zellen keinen Effekt hat.

Mechanismen der Rapamycin-vermittelten TRAIL-Sensitivierung

Der von Rapamycin vermittelte Mechanismus ist bis heute nicht vollständig verstanden, aber die Inhibition der Tumervaskularisierung (Sully et al., 2012), die Regulation der Familie der Bcl-2 Proteine (Li et al., 2013) und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials wurden als essenziell beschrieben. Die Behandlung mit Rapamycin führte zu einer Inhibition der Aktivität von Tumorassoziierten Ionenkanälen und zur Regulation von CD8⁺-Effektor-T-

Zellen (Sully et al., 2012). Die Kinase mTOR ist in der Lage durch die p70S6-Kinase und das Protein 4EBP1 den apoptotischen Zelltod zu kontrollieren. Es wurde beschrieben, dass Aktivierung der p70S6-Kinase durch mTOR die Apoptose blockieren kann und zwar durch Hochregulation der Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x_L und einer Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bad. In anderen Tumorentitäten wie Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass sich mTOR-Inhibitoren erfolgreich mit TRAIL kombinieren ließen (Panner et al., 2006) und es zu einer Aktivierung der Caspasenkaskade, zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien kam.

In Anlehnung an diese Daten konnte zwar eine Prozessierung der Initiatorcaspase-8 gezeigt werden, die jedoch nach Behandlung mit Rapamycin/TRAIL nicht signifikant verstärkt war. Im Gegensatz zu den Berichten steht die fehlende Aktivierung der Initiatorcaspase des intrinsischen Signalweges (Caspase-9) und die unvollständige Prozessierung der Effektorcaspase-3. Dies spricht für eine ausschlaggebende Rolle von nachgeschalteten Regulationsschritten und, vergleichbar zum PI3K-Inhibitor Wortmannin, eher für eine Caspasenunabhängige Apoptose. Ähnliche Berichte gibt es aus leukämischen T-Lymphozyten, die nach Rapamycinbehandlung zwar keine Veränderungen in der Expression von Bcl-2, p53, p21, p27 oder Rb zeigten, aber eine verminderte Expression von wichtigen Zellzyklusregulatoren, eine erhöhte Proteinexpression von Bak, Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential sowie eine starke ROS-Produktion. Diese Veränderungen waren mit einer fehlenden Caspasenaktivität verbunden (Choi et al., 2008).

Und in der Tat konnte hier eine maßgebliche Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges durch ein vermindertes mitochondriales Membranpotential gezeigt werden. Die Bedeutung der Mitochondrien für die Rapamycin-induzierte Sensitivierung konnte in Jurkat-Leukämiezellen gezeigt werden. Hier konnte die Bindung von mTOR an VDAC gezeigt werden und dass die Blockierung dieser Interaktion durch Bindung von Rapamycin an mTOR zu einer besseren und schnelleren Ausbildung der mitochondrialen Permeabilitätsporen (PTP, engl.: permeability transition pore) führte (Desai et al., 2002).

Die Bedeutung von ROS und der Bcl-2-Proteine für die Rapamycin-vermittelte Sensitivierung

Zu der Bedeutung von ROS in Bezug auf Rapamycin gibt es kontroverse Berichte. In Prostatakarzinomzellen und Leukämiezellen wurde nach Rapamycinbehandlung eine vermehrte ROS-Produktion nachgewiesen, die mit einer Aktivierung der p38-MAPK und der Aktivierung von JNK in Verbindung steht (Choi et al., 2008; Giampietri et al., 2012). In

Lungenkarzinomzellen führte Rapamycin zu einer Suppression der ROS-abhängigen Apoptose durch Selenomethionin (Suzuki et al., 2011). Andere Berichte haben gezeigt, dass Rapamycin in Nierenkarzinomzellen hauptsächlich durch ROS agiert (Osman et al., 2009). Vergleichbar zu Prostata-, Nierenkarziom- und Leukämiezellen sorgte Rapamycin auch in Melanomzellen für eine vermehrte ROS-Produktion.

Die Bcl-2-Proteine, die den intrinsischen Apoptosesignalweg kontrollieren, haben auf besondere Weise die Apoptoseinduktion von Rapamycin/TRAIL beeinflusst. Der Knockout von Bax und die Überexpression von Bcl-2 führten zu einer nahezu vollständigen Blockierung der Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose. Die entscheidende Rolle von Bax in der Apoptoseresistenz wurde durch die Anwendung eines N-terminal-spezifischen Antikörpers von Bax und von phosphospezifischen Antikörpern für Bax sichtbar, die eine frühe Aktivierung von Bax nachweisen konnte. So resultierte die Behandlung von Rapamycin alleine in einer signifikanten Aktivierung von Bax (Bax-NT) und einer Zunahme der aktivierenden Phosphorylierung an Threonin-167 von Bax bereits 2 h nach Behandlung, obwohl noch keine Apoptoseinduktion zu beobachten war. Folglich induziert Rapamycin selbst keine Apoptose, öffnet aber die Pforte für die Apoptoseinduktion anderer Stimuli wie TRAIL, wobei hier der Schalter die Aktivierung von Bax darstellt. Eine Vielzahl von Kinasen könnte an den Regulationsmechanismen der Bax-Phosphorylierung an Threonin-167 durch Rapamycin involviert sein, denn die Aktivierung von ASK-1, JNK, p38-MAPK, ERK1/2, PKC und CDKs durch ROS wurde bereits berichtet (Li et al., 2004; Verbon et al., 2012). Entscheidend aber ist, dass die Produktion von ROS und die frühe Aktivierung von Bax für die Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose von essenzieller Bedeutung zu sein scheinen.

Fazit

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Ergebnisse effiziente Strategien, um die bestehenden und induzierbaren Todesliganden-Resistenzen in Melanomzellen zu überwinden und auch vor diesen zu schützen. Die in dieser Arbeit angeführten Untersuchungen bieten eine Grundlage für das Verständnis der Mechanismen der Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzellen. Die Grundlage der Resistenz, die für das unterdrückte Ansprechen von Melanomzellen auf TRAIL zuständig ist, basiert auf vier wichtigen antiapoptotischen Schritten. Diese sind 1.) die hohen Level an Bcl-2-Proteinen, 2.) die hohen Level an cIAPs, 3.) die unterdrückte Aktivierung von Bax und 4.) die Herunterregulation der Todesrezeptoren (Kurbanov et al., 2007; Eberle et al., 2007b; Agrawal et al., 2008; Quast et al., 2012). So erscheint die Modulation der Bax-Phosphorylierungslevel, die die Aktivierung von Bax beeinflussen können (Kim et al., 2006a; Renault und Manon, 2011), als eine sehr geeignete Strategie um die TRAIL-Sensitivität von Melanomzellen zu erhöhen. Dies sollte bei einer effizienten therapeutische Strategien berücksichtigt werden. Aber auch Strategien zur Überwindung der IAPs durch SMAC-Mimetika (Fulda und Vucic, 2012) oder der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine durch Obatoclastin (Jiang et al., 2009; Espona-Fiedler et al., 2012) oder ABT-737 (Anvekar et al., 2012; Reuland et al., 2012) können TRAIL-Resistenzen überwinden und sollten für eine nachhaltige Melanomtherapie in Betracht gezogen werden.

Auch Kinaseinhibitoren, insbesondere Inhibitoren des PI3K-Akt/PKB-mTOR und des MAPK-Signalweges, scheinen für die Melanomtherapie erfolgversprechend zu sein. Daten aus den jüngsten klinischen Studien mit Vemurafenib, einem niedermolekularen Inhibitor gegen das mutierte BRAF, lassen einen Durchbruch bei der Melanomtherapie erhoffen (Sosman et al., 2012). Inhibition von BRAF fördert die Expression des proapoptotischen Proteins Bim. Die Inhibitoren des PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweges fördern dagegen die Aktivierung von Bax. Neben den Kinaseinhibitoren würden sich auch Inhibitoren der Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanäle für eine effektive Therapie anbieten, da sie bedeutende Faktoren wie SMAC und Bax positiv regulieren können. Die Verwendung von Senicapoc (KCa3.1-Inhibitor) bei der Therapie von Sichelzellanämie und diversen proliferativen Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen hat sich zudem als unbedenklich erwiesen (Wulff und Castle, 2010). Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine und der IAP-Antagonist SMAC repräsentieren sich als absolut essenziell für die Melanomtherapie, so dass deren Expression und Aktivierung für eine erfolgreiche Therapie Rechnung getragen werden sollte. Therapeutische Strategien zur Überwindung der TRAIL-Resistenz sollten gegebenenfalls darauf getestet werden, ob sie in der Lage sind, diese wichtigen proapoptotischen Faktoren zu regulieren.

Die Verwendung von Todesliganden könnte körpereigene Zellen bei der Immunantwort gegen das Melanom unterstützen, da Todesliganden für T-Lymphozyten physiologische Signale in der anti-tumoralen Immunüberwachung darstellen (Guicciardi und Gores, 2009). Hinsichtlich möglicher proapoptotischer Therapieansätze erscheint eine TRAIL-Monotherapie eher als ungenügend, da TRAIL in seiner Effizienz durch sich schnell entwickelnde Resistenzen gemindert wird (Dimberg et al., 2012b). Jedoch könnte die Verwendung von Todesrezeptorspezifischen agonistischen Antikörpern, deren Wirksamkeit bereits in klinischen Studien untersucht wird, in Kombination mit den hier verwendeten Signalwegsinhibitoren, TRAM-34, Wortmannin und Rapamycin zu einem Durchbruch in der TRAIL-vermittelten Therapie führen.

Material und Methoden

Zelllinien und Zellkultivierung

Zelllinien

(1) Humane maligne Melanom-Zelllinien

Folgende maligne Melanom-Zelllinien wurden verwendet: A-375 (Giard et al., 1973) und Mel-HO (Holzmann et al., 1988), gewonnen aus Primärtumoren. SK-Mel-13, SK-Mel-28 (Carey et al., 1976), MeWo (Kerbel et al., 1984) und Mel-2a (Bruggen et al., 1981) wurden aus Metastasen gewonnen.

(2) Subklone von A-375

Subklone von A-375 wurden aus parentalen A-375 Zellen mittels stabiler Transfektion eines pIRES-Bcl-2-Plasmids (A-375-Bcl-2) und eines pIRES-Leer-Plasmids (A-375-Mock) generiert. Das pIRES-Plasmid stammt von Clontech (Palo Alto, CA, USA) und die beschriebenen Subklone lagen zu Beginn dieser Doktorarbeit bereits im Labor vor (Raisova et al., 2001).

(3) TRAIL-resistente Melanomzelllinien

Zur Generierung TRAIL-resistenter Melanomzelllinien wurden parentale A-375, SK-Mel-13 und Mel-HO Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und kontinuierlich mit 100 ng/ml TRAIL für 8 - 10 Wochen selektiert. Nach Erreichen der Konfluenz der selektierten Zellen wurden diese passagiert und kontinuierlich in Wachstumsmedium mit 5 ng/ml TRAIL gehalten (Kurbanov et al., 2007).

(4) CH-11-resistente Melanomzelllinien

Parentale A-375 und Mel-HO Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und kontinuierlich mit 20 ng/ml antagonistischem CD95-Antikörper (CH-11) für 8 - 10 Wochen selektiert. Nachdem die selektierten Zellen ihre Konfluenz erreicht hatten wurden diese passagiert und kontinuierlich in Wachstumsmedium mit 5 ng/ml CH-11 gehalten (Kurbanov et al., 2007).

(5) Andere Zelllinien

Für die transiente Transfektion von KCa3.1 wurde die humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie HEK-293 (DSMZ, CRL-11268, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

Als Positivkontrolle für die Oberflächenexpression der Decoy-Rezeptoren wurden HeLa Zervixkarzinomzellen (ATCC, Maryland, MD, USA) und SW480 Kolonkarzinomzellen (ATCC) verwendet. Für die funktionelle Analyse von Bax, Bak und p53 wurden parentale HCT-116 Kolonkarzinomzellen (ATCC) mit funktionellem Bax, Bak und p53 verwendet. Isogene Sublinien haben entweder einen Bax-Knockout, einen Bak-Knockdown, einen Bax/Bak-Doppelknockdown oder eine p53-Defizienz. Die Bax/Bak-Zellklone wurden freundlicherweise von B. Vogelstein (John Hopkins Cancer Center, Baltimore, USA), die p53-Zellklone von A. Paschen/D. Schadendorf (Hauttumorzentrum Essen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Subzelllinien lagen bereits vor Beginn der Arbeit im Labor vor.

Zellkultur – Kultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Folgende Medien kamen zum Einsatz: 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. Folgende Zelllinien wurden damit kultiviert: A-375, A-375-TS, Mel-HO, Mel-HO-TS, SK-Mel-13, SK-Mel-13-TS, Mel-2a, MeWo, SK-Mel-28. Das Medium zur Kultivierung der TRAIL-selektierten Zellen wurde zusätzlich mit 5 ng/ml TRAIL versetzt, um die bestehende Resistenz aufrechtzuerhalten.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (32430, Gibco) mit 4,5 g/l Glucose, 25 mM HEPES, Glutamax, 10% FCS, Geneticin (Gibco, 50 mg/ml; 2 ml) und Hygromycin (Boehringer, 50 mg/ml; 0,5 ml) wurde als Medium für die Kultivierung der stabil transfizierten A-375-pIRES und A-375-Bcl-2 Zellklone verwendet.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (32430, Gibco) mit 4,5 g/l Glucose, 25 mM HEPES, Glutamax, Pyruvat, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin wurde zur Kultivierung der HEK-293 Zellen verwendet. RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) wurde zur Kultivierung der SW480 Kolonkarzinom- und der HeLa Zervixkarzinomzellen verwendet.

Die verwendeten Zelllinien wachsen adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen. Das Zellmedium wurde etwa jeden dritten Tag erneuert, wobei vor jedem Mediumwechsel die Zellen mit sterilem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gespült wurden, um tote Zellen und saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Um die Zellen zu passagieren, wurden diese mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden wurden sie mit Medium von der Kulturflasche ab gespült und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das FCS im Medium inaktiviert die proteolytischen Eigenschaften des Trypsins. Die Zellen wurden für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und das

Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Proliferationsrate mit entsprechender Zellzahl für die Versuche ausgesät oder weiter kultiviert.

Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen, trypsinisiert und in 10% FCS-haltigem Medium 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Das 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. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und langsam über Nacht bei -80°C eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Röhrchen in Stickstoff-Tanks überführt und bei -140°C aufbewahrt.

Verwendete agonistische Antikörper

Die Todesliganden-vermittelte Apoptose wurde mit folgenden Todesliganden bzw. Rezeptor-agonisten induziert: KillerTRAIL (soluble, human, rekombinant, ALX-201-073, Alexis, Gruenberg, 20 ng/ml), TNF- α (T-0157, Sigma, Taufkirchen, Deutschland, 10 ng/ml) und dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland, 10-100 ng/ml).

Verwendete Reagenzien

Als Pancaspasen/Panproteasen-Inhibitoren wurden Q-VD-OPh (Quinoline-Valine-Aspartic-CH₂-O-Phenyl, OPH109, MP Biomedicals, Solon, OH, USA) (10 μM) und zVAD-fmk (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, 10 μM) eingesetzt. Für die unterschiedlichen Strategien der TRAIL-Sensitivierung wurden die nachfolgenden Inhibitoren eingesetzt:

Wortmannin (gewonnen aus *Penicillium funiculosum*, B-9935, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (4-16 μM) und Rapamycin (gewonnen aus *Streptomyces hygroscopicus*; R0395, Sigma Aldrich) (80-160 nM) zur Blockierung des PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweges.

TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol) ((Wulff et al., 2000); freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von H. Wulff, San Diego, CA, USA) (200 nM – 80 μM) und das Skorpiongift Charybdotoxin (CTX, isoliert aus *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; C 7802, Sigma Aldrich) (100-200 nM) zur Inhibition des Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanals KCa3.1 (IK1).

Zur Induktion von ER-Stress wurde Tunicamycin (gewonnen aus *Streptomyces sp.*, T7765, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1-5 μM), ein Inhibitor der N-Acetylglucosamin-Transferase eingesetzt.

Zur Lösung des KillerTRAIL wurde ein entsprechender KillerTRAIL Lagerungspuffer (ALX-505-005, Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) verwendet.

Zellbiologische Methoden

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur multiparametrischen Analyse einzelner Zellen. Bei diesem Prinzip können Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Granularität oder der spezifischen Anfärbung detektiert werden. Suspensierte Zellen werden mit Überdruck durch eine Messkammer gedrückt. Beim Eintritt in die Kammer werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich mögliche Zellaggregate auflösen. Die so vereinzelt Zellen werden an einem Argonlaser (Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$) vorbeigeführt. Somit ergibt sich aus der Vorwärtsstreuung (FSC) des Lasers die Größe der Zelle und aus dem im rechten Winkel gestreuten Laserlicht, 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, was in der Analyse von fluoreszenzmarkierten Antikörpern Anwendung findet.

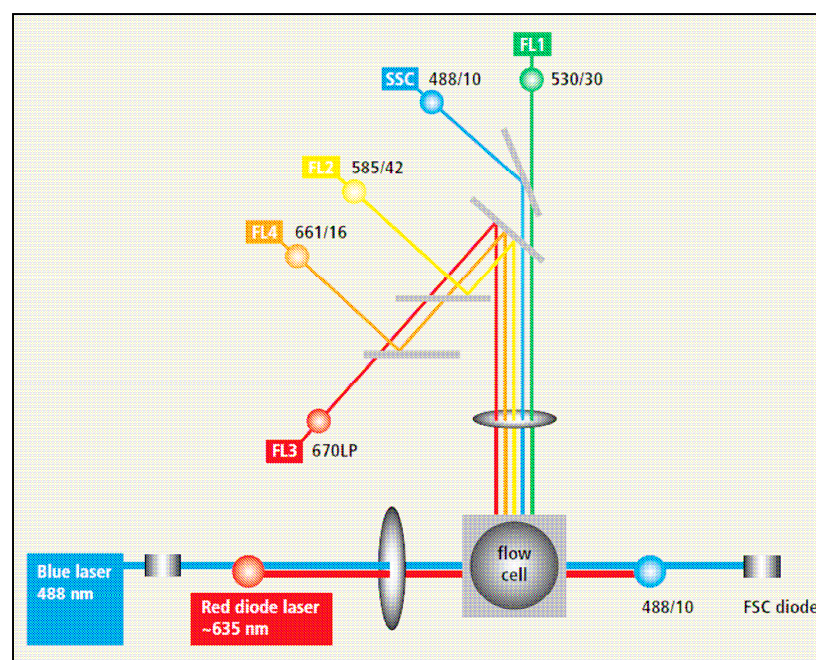


Abbildung 58: Optischer Aufbau eines FACSCalibur Durchflusszytometers.

(Quelle: BD FACS Broschüre; <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/index.jsp>)

Mit diesem Verfahren können Strukturen auf der Zelloberfläche oder nach Permeabilisierung der Zellen auch im Zellinneren nachgewiesen werden. Die hier 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).

Oberflächenexpression - Rezeptoren

Die Oberflächenexpression der zu analysierenden Rezeptoren erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Das Protokoll in Kürze: Für den Nachweis der Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren (DR4 und DR5) sowie der Decoy-Rezeptoren (DcR1 und DcR2) wurden die Zellen mittels EDTA gerntet und 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und 1×10^6 Zellen/ml in 100 μ l PBS mit 1% BSA resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Als Kontrolle wurde parallel die Bindung eines Isotyp-Kontrollantikörpers bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem sekundären PE-markiertem Antikörper für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Proben umgehend mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer (FL3; 10.000 Zellen) gemessen. Als Positivkontrollen für die Decoy-Rezeptoren wurden SW480 Kolonkarzinomzellen und HeLa Zervixkarzinomzellen verwendet.

Verwendete Antikörper: TRAIL-R1/DR4 (ALX-804-297, Alexis, HS101, 1:100); TRAIL-R2/DR5 (ALX-804-298, Alexis, HS201, 1:100); DcR1 (sc-65308, Santa Cruz, 1:100); DcR2 (sc-65311, Santa Cruz, 1:100); IgG1 Isotypen-Antikörper (clone MOPC-31C, 278-010, Ancell, Bayport, MN, USA; 1:100); Sekundärantikörper Phycoerythrin-markierter (PE) Ziege anti-Maus IgG1-Antikörper (ALX-211-201-C050, Alexis, 1:100).

Blockierungsexperimente – Rezeptoren

Für die Blockierungsexperimente wurden die Zellen mit selektiven, antagonistischen Antikörpern gegen TRAIL-R1/DR4 (ALX-804-297; Alexis, 10 μ g/ml) und TRAIL-R2/DR5 (Alx-804-298, Alexis, 10 μ g/ml) für 1 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit TRAIL und/oder verschiedenen Inhibitoren. Nach entsprechender Inkubationszeit (8-24 h) wurden die apoptotischen Zellen nach Propidiumjodid-Färbung mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Nachweismethoden – Apoptose

Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose ist die Fragmentierung der DNS. Für dieses Ereignis stehen verschiedene Nachweismethoden zur Verfügung. Zum einen gibt es einen ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zum direkten Nachweis von freien DNS-Enden, zum anderen den Nicoletti-Assay (Riccardi und Nicoletti, 2006), bei dem apoptotische Sub-G1-Zellpopulationen mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Propidiumjodid-Färbung quantifiziert werden.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis der DNS-Fragmentierung erfolgt mittels *Cell Death Detection ELISA* (Roche Applied Science, 11544675001, Mannheim, Deutschland). Bei dieser Methode werden Mono- und Oligonukleosomen nachgewiesen, die sich infolge der DNS-Fragmentierung in apoptotischen Zellen bilden (Eberle et al., 2003).

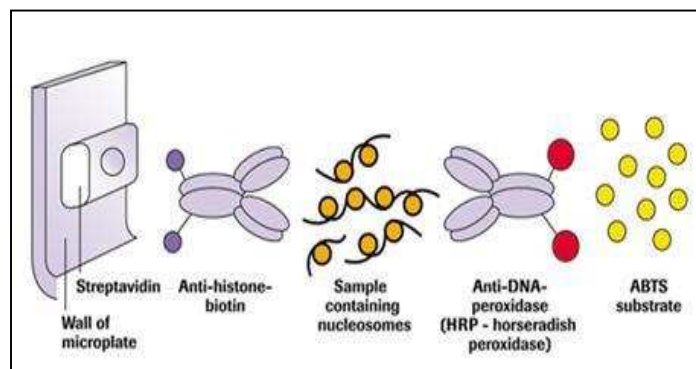


Abbildung 59: Prinzip des Cell Death Detection ELISA Assays.

Der Test wird in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte durchgeführt. Es bildet sich ein Komplex (Sandwich) aus anti-Histon-Biotin-Antikörper und anti-DNS-Peroxidase-Antikörper mit den Nucleosomen des Zellysates. Die Detektion erfolgt über das ABTS-Substrat.

(Abbildung aus dem Datenblatt; http://www.roche-appliedscience.com/proddata/gpip/3_5_3_21_2_1.html)

Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsinisiert und durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde für den Nekrose-Nachweis abgenommen und aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert, für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm). Für den Nachweis der DNS-Fragmentierung wurden 20 µl Lysat in eine mit Streptavidin beschichtete 96-Well-Platte (mitgeliefert) pipettiert und mit 80 µl Reagenzgemisch [bestehend aus biotinyliertem anti-Histon-Antikörper (1:20) und Peroxidase-konjugiertem anti-DNS-Antikörper (1:20, verdünnt in Inkubationspuffer, mitgeliefert)] für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte

dreimal (je 300 µl/Well) mit Inkubationspuffer gewaschen um so ungebundenen Antikörper zu entfernen und anschließend mit einer Peroxidase-Substratlösung (100 µl/Well; enthält ABTS = 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline Sulfonate)) für 10 min bei RT inkubiert. Direkt nach der Inkubation erfolgte die photometrische Bestimmung der gebundenen, Peroxidase-markierten Antikörper-DNS-Komplexe mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Propidiumjodid-Färbung

Die Quantifizierung des Anteils an apoptotischen, hypodiploiden Zellen (sub-G1-Zellfraktion), in Prozent, erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wird der DNS-Gehalt von Zellen mittels PI-Färbung nachgewiesen (Riccardi und Nicoletti, 2006).

Das Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (5 min, 1100 rpm) geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in einer PI-Färbelösung bestehend aus PI (50 µg/ml, sc-3541, Santa Cruz), Natriumcitrat (0,1%, S-4641, Sigma), Triton X-100 (0,1%, 37238, Serva) für mindestens 1 h inkubiert und der DNS-Gehalt der Kerne unter Verwendung des Fluoreszenzdetektors FL-3 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgt mittels der CellQuest Software oder WinMDI Software, Version 2.9.

Hoechstfärbung - Bisbenzimidfärbung

Für die Darstellung der Apoptose auf Einzelzellniveau verwendet man zur Zellkernanfärbung den Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst-33342). Bisbenzimid interkaliert in die DNS und färbt die Chromatin-Kondensation an. Apoptotische Zellkerne erscheinen nach Bisbenzimid-Färbung stärker angefärbt und von geringerer Größe als gesunde Zellkerne.

Das Protokoll in Kürze: Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 48 h nach Behandlung mit verschiedenen Reagenzien trypsiniert und mit PBS auf die Zellzahl 50.000/100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50.000 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung für 30 min bei 4°C fixiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Bisbenzimid-Färbelösung (1 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und dann in Mounting-Medium eingebettet. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden mindestens 200 Zellen pro Ansatz gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe der Gesamtzellzahl angegeben

Verwendete Reagenzien und Lösungen: Bisbenzimid, Sigma, Deutschland; 1 µg/ml in PBS

Bisbenzimid-Fixierungslösung: 4 g Formaldehyd ad 100 ml PBS;

Bisbenzimid-Permeabilisierungslösung: 0,2% Triton X-100 ad 100 ml PBS

Nachweismethode – Zytotoxizität/Nekrose

Der Nachweis der Zytotoxizität erfolgte mittels Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (LDH, Roche Applied Science; 11644793001). Durch äußere Einflüsse wie mechanische Schädigung oder Strahlung kann es zur Schädigung der Plasmamembran und damit zum Platzen der Zellen kommen. Hierbei wird unter anderem das Enzym Laktatdehydrogenase freigesetzt und kann mit Hilfe des *Cytotoxicity Detection Kit* im Zellkulturüberstand nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Messung der Aktivität erfolgt in zwei enzymatischen Reaktionen. Im ersten Schritt wird NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert durch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Im zweiten Schritt wird H^+/H^+ auf ein Tetrazoliumsalz übertragen, was dadurch zu Formazan reduziert wird (Farbumschlag). Die Aktivität der LDH im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen.

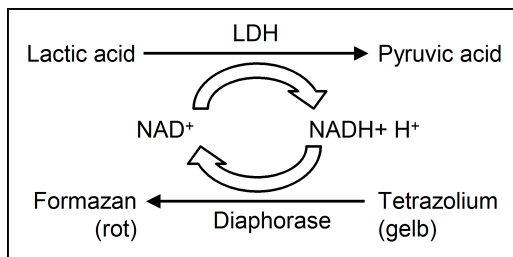


Abbildung 60: Prinzip des Cytotoxicity Detection Assays.

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Nachfolgend wird H^+/H^+ auf das Tetrazolium-Salz (gelb) übertragen, wodurch das photometrisch quantifizierbare Formazan-Salz (rot) entsteht (Abbildung aus dem Datenblatt).

Das Protokoll in Kürze: Der Zytotoxizitäts-Nachweis erfolgt parallel zum DNS-Fragmentierungs-ELISA oder zur Propidiumjodid-Färbung. 10 µl des Zellkulturüberstandes (zellfrei) wurden abgenommen und 1:4 mit PBS verdünnt und in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Zugabe von 50 µl des Reaktionsgemisches wurde die Platte für 20 min im Dunkeln unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach erfolgt die photometrische Bestimmung, mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000) bei 490 nm. Zur Auswertung des Versuchs wurde der blank-Wert (nur Medium) von allen Werten abgezogen, die unbehandelte Kontrolle auf den Wert 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Nachweis Proliferation - Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde die Zelldichte kontinuierlich über eine Echt-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis, RTCA, xCELLigence, Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) gemessen. Die Messtechnik basiert auf Mikroelektroden, die auf dem Boden jedes Wells einer speziellen 96-Well E-Platte integriert sind. Der Widerstand der Zellen in einem Well steht in direktem Verhältnis zur Zelldichte.

Das angewendete Protokoll in Kürze: Pro Well wurden 2.500 bis 5.000 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 Messintervallen zwischen 15 Minuten und 1 Stunde durchgeführt.

Nachweismethode – Zellvitalität

Nachweis der Zellvitalität, der Lebensfähigkeit der Zellen, erfolgte mittels WST-1 *Cell Proliferation Assay* (11644807, Roche Applied Science, Mannheim) welcher die Aktivität von mitochondrialen Enzymen nachweist.

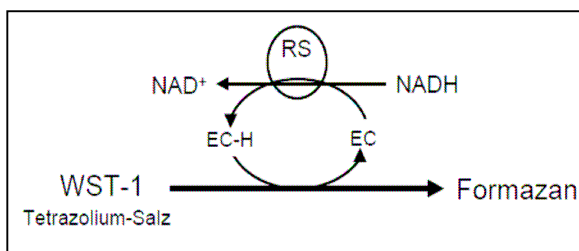


Abbildung 61: Prinzip des WST-1 Cell proliferation Assays.

Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat) zu Formazan. EC steht für Elektronenkopplungsreagenz; RS für das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System. (Abbildung aus dem Datenblatt).

Das Protokoll in Kürze: In 96-Well-Platten wurden $2,5 - 5 \times 10^4$ Zellen in 200 μ l Medium ausgesät und mit verschiedenen Reagenzien in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen behandelt. Nach 24 h wurden 100 μ l Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 10 μ l WST-1 Reagenz pro Well inkubiert. Die Umsetzung des Reagenzes wurde per ELISA-Reader bei der Wellenlänge 450 nm/690 nm bestimmt. Die Zellvitalität wurde, in Prozent bezogen, auf die unbehandelt Kontrolle (C = 100%) angegeben.

Nachweismethode – mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

Der Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) erfolgte mittels des nicht toxischen, kationischen Farbstoffes Tetramethylrhodamin Methylester-Perchlorate (TMRM⁺, T5428, Sigma). Der Nachweis basiert auf der Anreicherung des Farbstoffes, auf Basis seiner positiven Ladung, in den negativ geladenen Mitochondrien. Daher zeigt eine verminderte TMRM⁺-Fluoreszenz, gemessen im Durchflusszytometer, eine Störung in der Ladungstrennung der Mitochondrien an.

Das Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden trypsinisiert und geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 200 μ l TMRM⁺-Lösung (1 μ M) resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 μ 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.

Nachweismethode – ROS (reactive oxygen species)

Das Auftreten von intrazellulären ROS wurde durch den Farbstoff H₂DCFDA (2-, 7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) nachgewiesen.

Das Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden trypsinisiert und geerntet, mit PBS gewaschen und mit H₂DCFDA (50 μ M) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 μ 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.

Nachweismethode – Aktivierung von Bax

Die Aktivierung von Bax erfordert eine Konformationsänderung des inaktiv im Zytoplasma vorliegenden Proteins. Die Konformationsänderung erlaubt es Bax sowohl an die Mitochondrien zu translozieren als auch in die äußere Mitochondrienmembran zu insertieren (Dejean et al., 2005). Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit TRAIL, den Inhibitoren oder den entsprechenden Kombinationen zu einer Aktivierung von Bax und damit zu einer Konformationsänderung führt, wurden die behandelten Zellen mit einem aktivierungsspezifischen Antikörper, der den N-terminalen Bereich von Bax erkennt, inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Das Protokoll in Kürze: In 6-Well Platten wurden 2×10^5 Zellen pro Well ausplattiert und mit TRAIL +/- Wortmannin, Rapamycin oder TRAM-34 in einer Zeitkinetik für 1 h bis 8 h behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Trypsinisierung geerntet, mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Nach dem anschließenden Waschschrift wurden die Zellen für 15 Minuten mit einem Saponin-Puffer (1% FCS, 0,1% Saponin in PBS) inkubiert und im Anschluss bei 4°C für 1 h im Dunkeln mit dem Primäantikörper (Bax-NT, 1:100, #06-499, Upstate, Lake Placid, NY, USA) behandelt. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-FITC, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) für 30 Minuten, ebenfalls im Dunkeln und bei 4°C. Zum Abschluss wurden die Zellen erneut einmal gewaschen, das Zellpellet in Saponinpuffer resuspendiert und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer (Kanal FL-1) detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI Version 2.9.

Nachweismethode – Bax-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie

Neben der Konformationsänderung kann Bax auch über Phosphorylierung und Dephosphorylierung an definierten Positionen aktiviert werden. Die Phosphorylierung von Bax an Serin-184 durch Akt/PKB soll zu einer Inaktivierung von Bax führen (Kim et al., 2006a), während die Dephosphorylierung von Bax an Threonin-167 zu einer Aktivierung von Bax und damit zur mitochondrialen Translokation führen soll (Dejean et al., 2005). Um den Phosphorylierungsstatus von Bax nach Behandlung mit TRAIL, den Inhibitoren oder den Kombinationen zu untersuchen, wurden die behandelten Zellen mit phosphospezifischen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Das Protokoll in Kürze: Das Protokoll wurde wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Für die Analyse der Serin-184 Phosphorylierung wurde als Primäantikörper ein Phospho-Serin-184-Bax Antikörper (p-Ser184-Bax, A8297, Assay BioTech, Sunnyvale, CA, USA), für die Analyse der Threonin-Phosphorylierung ein Phospho-Threonin spezifischer Antikörper (p-Thr197-Bax, A0773, Assay BioTech) eingesetzt. Zur Kontrolle wurde ein Antikörper für Bax (N-20, sc-493, Santa Cruz Biotechnology) eingesetzt.

Proteinanalytik (Western Blot Analyse)

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten, durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladenen Proteine im elektrischen

Feld zur Anode. Durch einen Molekulargewichtsstandard (161-0374, Bio-Rad) kann die Größe der Proteine bestimmt werden. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, 0,2 µm, Whatman, Dassel) transferiert, auf der sie anschließend indirekt nachgewiesen werden können. Dies erfolgt durch die spezifische Bindung von primären Antikörpern, die ihrerseits durch sekundäre Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper gebunden werden. Mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase, die das ECL-Reagenz (*enhanced chemilumineszenz*) umsetzen kann, kommt es zur Emittierung von Lumineszenzlicht, das den Nachweis von Antigenen auf Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE, Buckinghamshire, UK) ermöglicht.

Herstellung von Proteinextrakte mit Standard-Lysepuffer

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

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Für die Analyse der Gesamtproteinextrakte wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (2 ml/Well) gewaschen, mit kaltem Standard-Lysepuffer (50 µl/Well) inkubiert und nach einigen Minuten mit einem Zellschaber (99003; TPP, Trasadingen, Schweiz) abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Extrakte wurden für 5 sek mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus, Typ MS-73, Bandelin, Berlin), zum Scheren der freigesetzte DNS, behandelt und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode (S.128) und die Lysate wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Herstellung von Proteinextrakte mit Phospho-Lysepuffer

Zur Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine wurden Proteinextrakte nach dem oben beschriebenen Protokoll hergestellt. Statt des Standard-Lysepuffers wurde hier ein spezieller Phospho-Lysepuffer verwendet.

(1) Verwendete Puffer und Reagenzien – Standard-Proteinlysate

Standard-Lysepuffer 10 ml: Tris-HCl 100 µl (1M, pH 7,5, T-1503, Sigma); NaCl 480 µl (3 M, 1.06404, Merck); SDS 500µl (10%, L-4390, Sigma); Nonidet P-40 50 µl (N-3516,

Sigma); Protease-Inhibitoren: Aprotinin 36 µl (10%, 10236624, Roche); Leupeptin 100 µl (11017101, Roche); Pepstatin 100 µl (0,5 mg/ml, 253286, Roche); PMSF 100 µl (100 mM, P-7626, Sigma); EDTA 20 µl (0,5 M, pH 8,0, 8418, Merck); Aqua bidest. 8,5 ml.

(2) Verwendete Puffer und Reagenzien – Phospho-Proteinlysate

Phospho-Lysepuffer 10 ml: 10x Cell Lysis Buffer 1 ml (#9803, Cell Signaling); PMSF 100 µl (100 mM, P-7626, Sigma); Aqua bidest. 8,9 ml und jeweils 1 Tablette PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Cocktail (04906845, Roche) und EDTA-Mini Protease-Inhibitor Cocktail (04693159001, Roche).

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). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ reagiert mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelatkomplex, dessen Absorption im ELISA-Reader gemessen werden kann.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die zu bestimmenden Proteinextrakte sowie die Eichlösung wurden in Triplikaten in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Für die Bestimmung wurden die Proteinextrakte (10 µl, 1:10 verd. in PBS) mit 200 µl Reaktionspuffer, bestehend aus Lösung A (4 µl) und Lösung B (196 µl) inkubiert. Als Eichlösung diente eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Platten-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten BSA-Konzentrationen konnte die Proteinmenge der Lysate bestimmt werden.

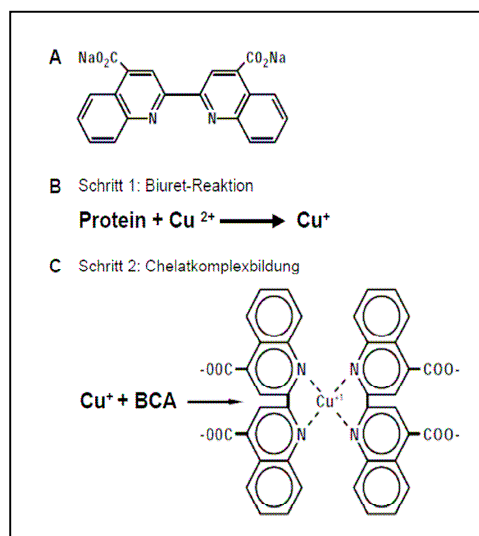


Abbildung 62: BCA-Nachweismethode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen.

(A) Bicinchoninsäure-Molekül (BCA); (B) Biuret-Reaktion bei der Proteine mit Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reagieren; (C) Ausbildung des violetten Cu^+ -Bicinchoninsäure-Komplexes (verändert nach Thermo Fischer Scientific Datenblatt)

Elektrophorese-Protokoll

Das für die SDS-PAGE benötigte Sammelgel (5%) und Trenngel (12%) wurde mit Hilfe des Elektrophoresesystems (Mini Protean II, BioRad) vor der Elektrophorese hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die Überschichtung abgegossen und mit Filterpapier nachgetrocknet. Das Sammelgel wurde darüber geschichtet und ein Gel-Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Proteinextrakte wurden mit Protein-Probenpuffer (4-fach) versetzt und 5-8 min bei 95°C denaturiert. Die Gel-Kämme wurden nach vollständiger Polymerisation entfernt, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer (1-fach) bedeckt. Die Taschen wurden mit Laufpuffer gespült, um diese von Luftblasen zu befreien. Anschließend wurden die Proben in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 80-120 V solange durchgeführt, bis die blaue Lauffront das Ende der Gele erreicht hat.

Verwendete Puffer und Reagenzien – Elektrophorese:

Sammelgel (5%-ig) 5 ml: Acryl-/Bisacrylamid 0,84 ml (30%, 37,5:1, 161-0158, Bio-Rad); Sammelgelpuffer 2,5 ml; Aqua bidest 1,6 ml; APS 100 μl (10%, 161-0700, Biorad); TEMED 10 μl (161-0800, Bio-Rad).

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

Trenngel (12%-ig) 10 ml: Acryl-/Bisacrylamid 4,0 ml (30%, 37,5:1); Trenngelpuffer 5,0 ml; Aqua bidest 1,0 ml; APS 100 μl (10%); TEMED 10 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.

Protein-Transfer-Protokoll

Der Blot, bestehend aus Nitrozellulosemembran und Trenngel, wurde in einer Wet-Blot-Kammer zusammengebaut, so dass das Gel zur Kathode hin ausgerichtet liegt und die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt. An den Außenseiten wurden je zwei Filterpapiere und je ein Schwamm gelegt um eine gleichmäßige Befeuchtung zu gewährleisten. Die Blot-Komponenten wurden im Blotpuffer luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Der Protein-Transfer wurde entweder bei 120V für 90 min auf Eis oder über Nacht bei 10V und Raumtemperatur durchgeführt. Zum Nachweis des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit PonceauS (P-7170, Sigma) angefärbt. Diese reversible Färbung der Membran wurde anschließend mit PBS-Tween wieder vollständig entfärbt. Schließlich wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur mit Trockenmilch (5%) in PBS-Tween inkubiert um so die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

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

Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

Die ECL-Lösung für eine Membran, bestehend aus 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl H₂O₂ (H-1009, Sigma), wird kurz vor Gebrauch gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach 2 min Inkubationszeit wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Folien in eine Filmkassette gelegt und Röntgenfilme in einer Dunkelkammer von einer Sekunde bis zu einer Stunde aufgelegt. Zur Auswertung wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm anhand des Proteinmarkers bzw. entsprechender Positivkontrollen identifiziert.

Verwendete Puffer und Reagenzien – ECL:

Lösung A: Natriumsalz von Luminol (50 mg, A-4685, Sigma) gelöst in 200 ml 0,1 M

Tris/HCl pH 8,6;

Lösung B: p-Hydroxycoumarinsäure (11 mg, C-9008, Sigma) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, 20385, Serva).

Verwendete Antikörper: Westernblot Analyse

Verwendete primäre Antikörper von Santa Cruz: AIF (D-20, sc-9416, 1:1000); Bax (N-20, sc-493,1:200); Bak (G-23, sc-832, 1:200); Bcl-2 (sc-509, 1:200); Bcl-xL (S-18, sc-634, 1:200); BECN1/Beclin (H-300, sc-11427, 1:1000); c-FLIPL/S (G-11, sc-5276,1:200); cIAP-1 (sc-7943, 1:200); cIAP-2 (sc-7944, 1:200); GAPDH (6C5, sc-32233, 1:1000); GADD153/CHOP (F-168, sc-575, 1:1000); IκBα (C-21, sc-371,1:200); IK1 (H-120, sc-32949, 1:200), IK1 (F-15, sc-27080, 1:100); Mcl-1 (sc-12756, 1:200); p53 (C-5, sc-7386, 1:500); Puma (G-3, sc-374223; 1:1000); SMAC (2D12, sc-56230, 1:1000); SQSTM1/p62 (D-3, sc-28359, 1:1000); Survivin (D-8, sc-17779, 1:200); VDAC1,2,3 (FL-283, sc-98708, 1:1000).

Verwendete primäre Antikörper von Cell Signalling: Akt (#9272; 1:1000), pAkt (Thr308) (244F9, #4056, 1:1000); pAkt (Ser473) ((D9E)XP, #4060, 1:1000); Bad (#9292; 1:1000); Bid (#2002, 1:1000); Caspase-8 (#9746, 1C12, 1:1000); Caspase-9 (#9502, 1:1000); Caspase-3 cleavage products (#9661, Asp175, 1:1000); Procaspase-3 (#9662,1:1000); PARP (46D11, #9532, 1:1000); p44/p42-MAPK (137F5, #4695, 1:1000); p-p44/p42 (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E, #4370, 1:1000); XIAP (#2042, 1:1000).

Verwendete primäre Antikörper anderer Firmen: TRAIL-R1/DR4 (ab8414, Acris Antibodies, Hiddenhausen, 1:500); TRAIL-R2/DR5 (ab8416, Acris Antibodies, 1:500); Puma (1652-1, Epitomics, 1:200); Noxa (2437, ProSci Inc., Poway; CA, USA, 1:200); Cytochrome c (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, 1:1,000); anti-Porin 31 HL (VDAC, 529536, Calbiochem, 1:5000); β-Actin (A5541, Sigma-Aldrich, 1:5000); Prohibitin (Ab-1 Clone II-14-10, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA, 1:1000); Kcnn4/IK1 (LS-A9581, MBL, Woburn MA, USA, 1:1000); BiP/GRP78 (610979, BD Transduction Laboratories, CA, USA, 1:1000)

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

Herstellung von Zellfraktionierungslysaten

Zur Bestimmung von aus den Mitochondrien freigesetzten proapoptotischen Faktoren (Cytochrom C, SMAC, AIF) sowie der mitochondrialen Translokation von Bax wurden die Mitochondrien aus den zu analysierenden Zellen mit Hilfe eines Mitochondrien-Fraktionierungs-Kits (PromoKine, PK-CA577-K256-100, Heidelberg, Deutschland) isoliert.

Das angewendete Protokoll in Kürze: $1-5 \times 10^7$ Zellen wurden geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

in einem Glas-Homogenisator homogenisiert, bis etwa 60-75% der Zellen aufgebrochen waren. Um Zelltrümmer zu entfernen wurden die homogenisierten Zellen für 10 min mit 800 g bei 4°C zentrifugiert. Zur Mitochondrien-Isolierung wurde der Überstand abgenommen und erneut für 30 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand enthielt die zytosolische Fraktion (Cyto) und wurde bei -20°C eingefroren. Das entstandene Pellet mit der mitochondrialen Fraktion (Mito) wurde in 100 µl Mitochondrien-Extraktionspuffer resuspendiert und ebenfalls bei -20°C eingefroren.

Verwendete Lösungen pro Punkt: 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer; 1 ml Mitochondrien-Extraktionspuffer versetzt mit 2 µl Proteaseinhibitor-Cocktail und 1 µl DTT.

Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxipräparation)

Die Maxipräparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Qiagen-Protokoll Kit (EndoFree Plasmid Maxi Kit; 12362, Qiagen, Hilden, Deutschland). Diese Methode diente der Isolierung von größeren, sehr reinen DNS-Mengen, die zur Transfektion der Zellen verwendet wurde. Dabei wurden in einem Erlenmeyerkolben 200-250 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt) mit einer einzigen Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension in 300 ml Beckmann-Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Die Plasmid-Isolierung erfolgte anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers. Das verwendete Expressionsplasmid mit der vollständigen cDNA Sequenz von Bax (mit einem 3'-Myc-Tag) basiert auf dem pcDNA3 Plasmid und lag vor Beginn der Doktorarbeit bereits im Labor vor. Das Plasmid für die Expression von humanem IK1 basiert auf einem pcDNA3 Plasmid und wurde von A. Schwab (Universität Münster) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das pcDNA3.1-Leerplasmid (Invitrogen, Deutschland) diente als Mock-Kontrolle. Das Plasmid für die Expression von XIAP (Plasmid mit der vollständigen humanen cDNS von XIAP) basiert auf einem pCMV-Sport6-Plasmid, das bei ImaGenes (Klon IRATp970H0655D, Source BioScience, ImaGene, Berlin, Deutschland) gekauft wurde.

Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion wurden 2×10^5 Zellen/well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit Serum-freiem Opti-MEM Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) gewaschen und mit 1 ml Transfektionslösung (Opti-MEM plus 2,5-5 µg/ml Plasmid-DNS und 0,1% DMRIE-C (10459-014, Invitrogen)) pro Well bei 37°C für 4 h transfiziert. Nach der Transfektion wurde das Transfektions-Medium

abgesaugt, die Zellen für 24 h mit 2 ml Wachstumsmedium inkubiert und anschließend behandelt und analysiert.

siRNS-vermittelte Herunterregulation von SMAC und Bid

Für die siRNS-vermittelte Herabregulation von SMAC und Bid wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 70% transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte ebenfalls in Serum-freiem Opti-MEM Medium, wobei 20 pmol siRNS und 4 µl TurboFect (#R1409, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pro Well eingesetzt wurden. Die Behandlung mit TRAIL +/- Inhibitoren erfolgte nach weiteren 24 h. Die siRNSs für SMAC (sc-36505), Bid (sc-29800) und die Kontrolle (scramble, sc-37007) wurden bei Santa Cruz Biotechnology Inc. gekauft.

Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden Melanomzellen (2×10^6) mit dem Myc-Bax-Expressionsplasmid transient transfiziert und 24-48 h später mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Lysepuffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8) inkubiert und geerntet. Die Immunpräzipitation des Myc-markierten Bax erfolgte mit dem µMACS c-myc-markiertem Protein Isolations-Kit (Milteny BioTech, Bergisch-Gladbach, Deutschland). Das Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Immunopräzipitation wurden an einen anti-Myc-Antikörper gekoppelte Mikroperlen (engl.: Microbeads) verwendet, die zu den Lysaten gegeben wurden. Diese Antikörper-gekoppelten Mikroperlen erkennen das Myc-markierte Bax und binden an das Protein. Dieser gesamte Komplex wurde dann anschließend über eine magnetische Säule isoliert.

Vor dem Eluieren wurde die Säule insgesamt viermal mit Waschpuffer 1 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) und einmal mit Waschpuffer 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem auf 95 °C erhitzten Elutionspuffer (50 mM DTT, 1% SDS, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8). Die Untersuchung der Immunopräzipitation erfolgte mittels Western Blot Analyse.

Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle Versuche bestehen aus Triplikaten und mindestens zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden so berechnet, dass alle Einzelwerte der unabhängigen Experimente mit einbezogen wurden. Die Signifikanz wurde bei Normalverteilung mit Hilfe des Student'schen t -Tests bestimmt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p -Wert $< 0,05$ (*), als hoch signifikant mit einem p -Wert $< 0,01$ (**) bewertet.

Literaturverzeichnis

- Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R (2000) The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Mechanisms of Cell Death* 926: 52-63.
- Adams JM, Cory S (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 715-720.
- Adams JM, Cory S (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19: 488-496.
- Adler V, Yin ZM, Tew KD, Ronai Z (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18: 6104-6111.
- Agrawal SG, Liu FT, Wiseman C, Shirali S, Liu H, Lillington D, Du MQ, Syndercombe-Court D, Newland AC, Gribben JG, Jia L (2008) Increased proteasomal degradation of Bax is a common feature of poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111: 2790-2796.
- Almasan A, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 337-348.
- Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto A, Tanno S, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR (2003) Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas (vol 87, pg 470, 2002). *Journal of Cellular Biochemistry* 88: 470-476.
- Anvekar RA, Ascioffa JJ, Lopez-Rivera E, Floros KV, Izadmehr S, Elkhohli R, Belbin G, Sikora AG, Chipuk JE (2012) Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens. *Cell Death Dis* 2012: 1-11.
- Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer* 2: 420-430.
- Ataga KI, Stocker J (2009) Senicapoc (ICA-17043): a potential therapy for the prevention and treatment of hemolysis-associated complications in sickle cell anemia. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18: 231-239.
- Ayral-Kaloustian S, Gu JX, Lucas J, Cinque M, Gaydos C, Zask A, Chaudhary I, Wang JY, Di L, Young M, Ruppen M, Mansour TS, Gibbons JJ, Yu K (2010) Hybrid Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Design, Synthesis, and Superior Antitumor Activity of Novel Wortmannin-Rapamycin Conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry* 53: 452-459.
- Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G (2010) From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*.
- Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G (2010) From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010.

- Basalingappa KM, Rajendran VM, Wonderlin WF (2011) Characteristics of Kcnn4 channels in the apical membranes of an intestinal epithelial cell line. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301: G905-G911.
- Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 87: 245-313.
- Bedard K, Lardy B, Krause KH (2007) NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie* 89: 1107-1112.
- Belyanskaya LL, Marti TM, Hopkins-Donaldson S, Kurtz S, Felley-Bosco E, Stahel RA (2007) Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol Cancer* 6: 1-13.
- Benzaquen LR, Brugnara C, Byers HR, Gattonicelli S, Halperin JA (1995) Clotrimazole Inhibits Cell-Proliferation In-Vitro and In-Vivo. *Nature Medicine* 1: 534-540.
- Berger A, Quast SA, Plotz M, Hein M, Kunz M, Langer P, Eberle J (2010) Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative- Enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Biochem Pharmacol.*
- Berger A, Quast SA, Plötz M, Kammermeier A, Eberle J (2013) Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by BMS-345541 correlates with altered phosphorylation and activation of Bax. *Cell Death Dis* e477.
- Blank CU, Hooijkaas AI, Haanen JB, Schumacher TN (2011) Combination of targeted therapy and immunotherapy in melanoma. *Cancer Immunology Immunotherapy* 60: 1359-1371.
- Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 725-731.
- Borutaite V, Brown GC (2001) Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. *Febs Letters* 500: 114-118.
- Bozulich L, Hemmings BA (2009) PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 256-261.
- Bratton SB, Salvesen GS (2010) Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *Journal of Cell Science* 123: 3209-3214.
- Brenner D, Krammer PH, Arnold R (2008) Concepts of activated T cell death. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 66: 52-64.
- Breslow A (1970) Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery* 172: 902-&.
- Bruggen J, Fogh J, Sorg C (1981) Tumor Production in the Nude-Mouse, Fibrinolytic-Activity and Cross-Reactivity with Anti-Melanoma Sera of Various Human-Tumor Cell-Lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 102: 141-152.

- Bundscherer A, Hafner C, Maisch T, Becker B, Landthaler M, Vogt T (2008) Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines. *Oncology Reports* 19: 547-553.
- Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S (2010) Molecular Interplay between Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), Amyloid-beta, and Tau EFFECTS ON COGNITIVE IMPAIRMENTS. *Journal of Biological Chemistry* 285: 13107-13120.
- Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ (1976) Cell-Surface Antigens of Human Malignant-Melanoma - Mixed Hemadsorption Assays for Humoral Immunity to Cultured Autologous Melanoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 3278-3282.
- Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin AM, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MHT, Blanchard KL, Thomas JE (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448: 439-4U1.
- Carraway H, Hidalgo M (2004) New targets for therapy in breast cancer: mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists. *Breast Cancer Res* 6: 219-224.
- Chai JJ, Du CY, Wu JW, Kyin S, Wang XD, Shi YG (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406: 855-862.
- Chen XF, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, Pandey SK, Nwokorie C, Onwudiwe N, Srivastava RK (2001) Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* 20: 6073-6083.
- Chen YW, Wang BC, Xiao YT (2012) PI3K: A potential therapeutic target for cancer. *Journal of Cellular Physiology* 227: 2818-2821.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell* 37: 299-310.
- Choi SJ, You HS, Chung SY (2008) Rapamycin-induced cytotoxic signal transduction pathway. *Transplant Proc* 40: 2737-2739.
- Chou CC, Lunn CA, Murgolo NJ (2008) KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert Rev Mol Diagn* 8: 179-187.
- Christofferson DE, Yuan JY (2010) Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology* 22: 263-268.
- Clark WH (1991) Tumor Progression and the Nature of Cancer. *British Journal of Cancer* 64: 631-644.
- Clark WH, From L, Bernardi EA, Mihm MC (1969) Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of Skin. *Cancer Research* 29: 705-&.
- Collins AR (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21: 238-246.

- Cretney E, Takeda K, Smyth MJ (2007) Cancer: Novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 280-286.
- D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, Emanuele S, Di Fiore R, Vento R, Tesoriere G (2012) Parthenolide induces caspase-independent and AIF-mediated cell death in human osteosarcoma and melanoma cells. *J Cell Physiol* Epub ahead of print. doi: 10.1002/jcp.24131.
- Dahl C, Guldberg P (2007) The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* 115: 1161-1176.
- Dancey J (2010) mTOR signaling and drug development in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7: 209-219.
- Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJF, Gershenwald JE, Mills GB (2008) A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British Journal of Cancer* 99: 1265-1268.
- de Braud F, Khayat D, Kroon BBR, Valdaghi R, Bruzzi P, Cascinelli N (2003) Malignant melanoma. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 47: 35-63.
- De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabo I, Zoratti M (2009) Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium* 45: 509-516.
- Degli-Esposti M (1999) To die or not to die - the quest of the TRAIL receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 65: 535-542.
- Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Tejjido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Jonas EA, Kinnally KW (2005) Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Molecular Biology of the Cell* 16: 2424-2432.
- Desai BN, Myers BR, Schreiber SL (2002) FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4319-4324.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke H, Welsh K, Salvesen G, Reed JC (1999a) Cleavage of human Inhibitor of Apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Blood* 94: 155B.
- Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC (1999b) Endogenous inhibitors of caspases. *Journal of Clinical Immunology* 19: 388-398.
- Di Pietro R, Zauli G (2004) Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *Journal of Cellular Physiology* 201: 331-340.
- Dillon RL, Muller WJ (2010) Distinct Biological Roles for the Akt Family in Mammary Tumor Progression. *Cancer Research* 70: 4260-4264.

- Dimberg LY, Cabrera H, Menke C, Behbakht K, Porter CC, Taan AC, Thorburn A, Ford HL (2012a) Use of a Genome-wide Loss-of-function Screen to Identify Novel Mechanisms of Resistance to TRAIL Induced Apoptosis. *European Journal of Cancer* 48: 31-32.
- Dimberg Y, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A, Ford HL (2012b) On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2012.164.
- Dogan T, Harms GS, Hekman M, Karreman C, Oberoi TK, Alnemri ES, Rapp UR, Rajalingam K (2008) X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol* 10: 1447-1455.
- Downward J (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 177-182.
- Dronca RS, Allred JB, Perez DG, Nevala WK, Lieser EA, Thompson M, Maples WJ, Creagan ET, Pockaj BA, Kaur JS, Moore TD, Marchello BT, Markovic SN (2013) Phase II Study of Temozolomide (TMZ) and Everolimus (RAD001) Therapy for Metastatic Melanoma: A North Central Cancer Treatment Group Study, N0675. *Am J Clin Oncol*.
- Duong-Ly KC, Peterson JR (2013) The human kinome and kinase inhibition. *Curr Protoc Pharmacol* 2.
- Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, Rowert-Huber J, Stockfleth E (2007a) Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *Br J Dermatol* 156 Suppl 3: 18-24.
- Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Wieder T, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC (2003) CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* 22: 9131-9141.
- Eberle J, Hossini AM (2008) Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. *Current Genomics* 9: 409-419.
- Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF (2007b) Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* 10: 218-234.
- Eckelman BP, Drag M, Snipas SJ, Salvesen GS (2008) The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death and Differentiation* 15: 920-928.
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *Embo Reports* 7: 988-994.
- Elliott JI, Higgins CF (2003) IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep* 4: 189-194.
- Espona-Fiedler M, Soto-Cerrato V, Hosseini A, Lizcano JM, Guallar V, Quesada R, Gao T, Pérez-Tomás R (2012) Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: prodigiosin vs. obatoclax. *Biochem Pharmacol* 83: 489-496.

- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H (2007) TRAIL signalling: Decisions between life and death. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 1462-1475.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou JM, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance K-Ca channel, IKCa1. *Journal of Biological Chemistry* 274: 5746-5754.
- Fas SC, Baumann S, Zhu JY, Giaisi M, Treiber MK, Mahlknecht U, Krammer PH, Li-Weber M (2006) Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF alpha- and TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 108: 3700-3706.
- Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 73: 1907-1916.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 10: 76-100.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010) Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* 363: 809-819.
- Foster JG, Blunt MD, Carter E, Ward SG (2012) Inhibition of PI3K Signaling Spurs New Therapeutic Opportunities in Inflammatory/Autoimmune Diseases and Hematological Malignancies. *Pharmacological Reviews* 64: 1027-1054.
- Franke JC, Plotz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J (2010) New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochem Pharmacol* 79: 575-586.
- Frost P, Berlinger E, Mysore V, Hoang B, Shi Y, Gera J, Lichtenstein A (2013) Mammalian target of rapamycin inhibitors induce tumor cell apoptosis in vivo primarily by inhibiting VEGF expression and angiogenesis. *J Oncol* 2013.
- Fruman DA (2010) Phosphoinositide 3-Kinases- Chapter 132. *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* 2: 1049-1060.
- Fulda S (2009a) Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins: novel insights into the cancer-relevant targets for cell death induction. *ACS Chem Biol* 4: 499-501.
- Fulda S (2009b) Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* 124: 511-515.
- Fulda S (2010) Exploiting mitochondrial apoptosis for the treatment of cancer. *Mitochondrion* 10: 598-603.
- Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811.
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2002) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21: 2283-2294.

- Fulda S, Vucic D (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 11: 109-124.
- Galban S, Duckett CS (2010) XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death and Differentiation* 17: 54-60.
- Garbe C, Leiter U (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 27: 3-9.
- Garcia-Echeverria C (2009) Protein and lipid kinase inhibitors as targeted anticancer agents of the Ras/Raf/MEK and PI3K/PKB pathways. *Purinergic Signalling* 5: 117-125.
- Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM (2004) Phosphorylation of Bax Ser(184) by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 279: 21085-21095.
- Garlid KD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1606: 23-41.
- Gavrilova-Ruch O, Schonherr K, Gessner G, Schonherr R, Klapperstuck T, Wohlrab W, Heinemann SH (2002) Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol* 188: 137-149.
- Giampietri C, Petrunaro S, Padula F, D'Alessio A, Marini ES, Facchiano A, Filippini A, Ziparo E (2012) Autophagy modulators sensitize prostate epithelial cancer cell lines to TNF-alpha-dependent apoptosis. *Apoptosis* 17: 1210-1222.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In-Vitro Cultivation of Human Tumors - Establishment of Cell Lines Derived from A Series of Solid Tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51: 1417-1423.
- Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Muer A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dorken B, Daniel PT (2010) Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* 188: 851-862.
- Gold MG, Barford D, Komander D (2006) Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Current Opinion in Structural Biology* 16: 693-701.
- Goldin LR, Landgren O (2009) Autoimmunity and lymphomagenesis. *Int J Cancer* 124: 1497-1502.
- Gomez-Lazaro M, Galindo MF, De Mera RMMF, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF, Comella JX, Prehn JHM, Jordan J (2007) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Molecular Pharmacology* 71: 736-743.
- Gonzalvez F, Ashkenazi A (2010) New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29: 4752-4765.
- Goossens V, De Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompernelle K, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J (1999) Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors* 10: 145-156.

- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.
- Gremel G, Rafferty M, Lau TYK, Gallagher WM (2009) Identification and functional validation of therapeutic targets for malignant melanoma. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 72: 194-214.
- Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC (2000) Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19: 4604-4610.
- Guertin DA, Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine* 11: 353-361.
- Guicciardi ME, Gores GJ (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J* 23: 1625-1637.
- Gyrd-Hansen M, Meier P (2010) IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 561-574.
- Hafsi S, Pezzino FM, Candido S, Ligresti G, Spandidos DA, Soua Z, McCubrey JA, Travali S, Libra M (2012) Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (Review). *International Journal of Oncology* 40: 639-644.
- Hahn M, Li W, Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S (2005) Rapamycin and UCN-01 synergistically induce apoptosis in human leukemia cells through a process that is regulated by the Raf-1/MEK/ERK, Akt, and JNK signal transduction pathways. *Mol Cancer Ther* 4: 457-470.
- Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S (1998a) Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Towards Prolongation of the Healthy Life Span* 854: 328-335.
- Hampton MB, Winterbourn CC, Stamenkovic I (1998b) Mechanisms of caspase inactivation by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25: S89.
- Harada H, Grant S (2003) Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7: 117-138.
- Harmer M, Denoix P, Hamperl H (1970) The TNM-system. *Aktuelle Probl Chir* 14: 25-36.
- Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, Riess ML, Varadarajan SG, Camara AKS (2007) Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca(2+)-sensitive K(+) channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293: H1400-H1407.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- 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 (2010a) 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.
- Herbst RS, Kurzrock R, Hong DS, Valdivieso M, Hsu CP, Goyal L, Juan G, Hwang YC, Wong S, Hill JS, Friberg G, LoRusso PM (2010b) A First-in-Human Study of Conatumumab in Adult Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 16: 5883-5891.

- Hersey P, Zhang XD (2003) Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 196: 9-18.
- Holzmann B, Lehmann JM, Zieglerheitbrock HWL, Funke I, Riethmuller G (1988) Glycoprotein P3.58, Associated with Tumor Progression in Malignant-Melanoma, Is A Novel Leukocyte Activation Antigen. *International Journal of Cancer* 41: 542-547.
- Hornle M, Peters N, Thayaparasingham B, Vorsmann H, Kashkar H, Kulms D (2010) Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*.
- Hossini AM, Eberle J (2008) Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochemical Pharmacology* 76: 1612-1619.
- Huttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I (2011) The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* 11: 369-381.
- Huwe A, Mazitschek R, Giannis A (2003) Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 2122-2138.
- Igney FH, Krammer PH (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology* 71: 907-920.
- Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 11651-11656.
- Ivanov VN, Hei TK (2011) Regulation of apoptosis in human melanoma and neuroblastoma cells by statins, sodium arsenite and TRAIL: a role of combined treatment versus monotherapy. *Apoptosis* 16: 1268-1284.
- Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, Huang SX, Zhou H, Hei TK (2008) Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res* 314: 1163-1176.
- Jager H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S (2004) Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol* 65: 630-638.
- Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H (2000) Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 356: 1728-1733.
- Jensen BS, Hertz M, Christophersen P, Madsen LS (2002) The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a possible target for immune suppression. *Expert Opin Ther Targets* 6: 623-636.

- Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Kiejda KA, Mhaidat N, Wang YF, Thorne R, Zhang XD, Hersey P (2007) Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. *Cancer Res* 67: 5880-5888.
- Jiang CC, Wroblewski D, Yang F, Hersey P, Zhang XD (2009) Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress are more susceptible to apoptosis induced by the BH3 mimetic obatoclax. *Neoplasia* 11: 945-955.
- Jin ZY, McDonald ER, Dicker DT, El Deiry WS (2004) 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. *Journal of Biological Chemistry* 279: 35829-35839.
- Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nature Reviews Cancer* 8: 782-798.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW (2002) Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
- Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11013-11018.
- Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DCS, Bouillet P, Thomas HE, Borner C, Silke J, Strasser A, Kaufmann T (2009) XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460: 1035-U128.
- Kandasamy K, Srivastava RK (2002) Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Research* 62: 4929-4937.
- Kannappan R, Ravindran J, Prasad S, Sung B, Yadav VR, Reuter S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) 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.
- Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ (2012) Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation* 19: 42-50.
- Kelley SK, Ashkenazi A (2004) Targeting death receptors in cancer with Apo2/TRAIL. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 333-339.
- Kelly PN, Strasser A (2011) The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation* 18: 1414-1424.
- Kerbel RS, Man MS, Dexter D (1984) A Model of Human Cancer Metastasis - Extensive Spontaneous and Artificial Metastasis of A Human Pigmented Melanoma and Derived Variant Sublines in Nude-Mice. *Journal of the National Cancer Institute* 72: 93-108.

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-&.
- Kim BJ, Ryu SW, Song BJ (2006a) JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 281: 21256-21265.
- Kim DS, Jeon BK, Lee YE, Woo WH, Mun YJ (2012) Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJD, Cheng EHY (2006b) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology* 8: 1348-1U19.
- Kim KH, Fisher MJ, Xu SQ, El Deiry WS (2000) Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clinical Cancer Research* 6: 335-346.
- Kim R, Emi M, Tanabe K (2005) Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biology & Therapy* 4: 924-933.
- Koolman und Röhm. (1998) Taschenatlas der Biochemie. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews Immunology* 7: 532-542.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163.
- Kumar S (1999) Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death and Differentiation* 6: 1060-1066.
- Kunzelmann K (2005) Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 205: 159-173.
- Kuphal S, Bosserhoff A (2009) Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *Journal of Pathology* 219: 400-409.
- Kurbanov BM, Fecker LF, Geilen CC, Sterry W, Eberle J (2007) 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.
- Kurbanov BM, Geilen CC, Fecker LF, Orfanos CE, Eberle J (2005) Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Invest Dermatol* 125: 1010-1019.
- Labrinidis A, Diamond P, Martin S, Hay S, Liapis V, Zinonos I, Sims NA, Atkins GJ, Vincent C, Ponomarev V, Findlay DM, Zannettino ACW, Evdokiou A (2009) Apo2L/TRAIL Inhibits Tumor Growth and Bone Destruction in a Murine Model of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* 15: 1998-2009.

- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG (2008) IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275.
- Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, Bidaux G, Urbain R, Gosset P, Delcourt P, Fleurisse L, Slomianny C, Dewailly E, Mauroy B, Bonnal JL, Skryma R, Prevarskaya N (2009) Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 28: 1792-1806.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation* 14: 44-55.
- Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM (2003) Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1553-C1560.
- Lasithiotakis KG, Sinnberg TW, Schittek B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, Garbe C, Meier FE (2008) Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* 128: 2013-2023.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* 118: 265-267.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death and Differentiation* 10: 66-75.
- Lee CC, Yang HL, Way TD, Kumar KJS, Juan YC, Cho HJ, Lin KY, Hsu LS, Chen SC, Hseu YC (2012) Inhibition of Cell Growth and Induction of Apoptosis by *Antrodia camphorata* in HER-2/neu-Overexpressing Breast Cancer Cells through the Induction of ROS, Depletion of HER-2/neu, and Disruption of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Lee EL, Hasegawa Y, Shimizu T, Okada Y (2008) IK1 channel activity contributes to cisplatin sensitivity of human epidermoid cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1398-C1406.
- Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 589-598.
- Lemke LE, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, Powis G (1999) Wortmannin inhibits the growth of mammary tumors despite the existence of a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 44: 491-497.
- Li DC, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T (2004) Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Science* 95: 644-650.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.

- Li X, Wu D, Shen J, Zhou M, Lu Y (2013) Rapamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression levels of Bcl-2 and Bax. *Oncol Lett* 5: 167-172.
- Li Y, Wang H, Wang Z, Makhija S, Buchsbaum D, LoBuglio A, Kimberly R, Zhou T (2006) Inducible resistance of tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2-mediated apoptosis by generation of a blockade at the death domain function. *Cancer Research* 66: 8520-8528.
- Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B (2011) Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414: 5-8.
- Lipson EJ, Drake CG (2011) Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research* 17: 6958-6962.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang XD (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490.
- Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treatment Reviews* 35: 280-288.
- Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F, Mijatovic S (2012) Resistance to TRAIL and how to surmount it. *Immunologic Research* 52: 157-168.
- Manning G (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook* 13: 1-19.
- Marone R, Erhart D, Mertz AC, Bohnacker T, Schnell C, Crniljanovic V, Stauffer F, Garcia-Echeverria C, Giese B, Maira SM, Wymann MP (2009) Targeting Melanoma with Dual Phosphoinositide 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors. *Molecular Cancer Research* 7: 601-613.
- Maryanovich M, Gross A (2012) A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol* 916: 1-6.
- Masci P, Borden EC (2002) Malignant melanoma: Treatments emerging, but early detection is still key. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 69: 529-+.
- McCubrey JA, Franklin RA (2006) Reactive oxygen intermediates and signaling through kinase pathways. *Antioxidants & Redox Signaling* 8: 1745-1748.
- Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC (2010) IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* 17: 53-64.
- Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M (2005) The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 10: 2986-3001.
- Melnikova I, Golden J (2004) Apoptosis-targeting therapies. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 905-906.

- Min HB, Ghatnekar GS, Ghatnekar AV, You XH, Bu M, Guo XY, Bu SZ, Shen B, Huang Q (2012) 2-Methoxyestradiol induced bax phosphorylation and apoptosis in human retinoblastoma cells via p38 MAPK activation. *Molecular Carcinogenesis* 51: 576-585.
- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, Hideshima T, Anderson KC (2001) TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98: 795-804.
- Moad AI, Tengku Muhammad TS, Oon CE, Tan ML (2013) Rapamycin Induces Apoptosis When Autophagy is Inhibited in T-47D Mammary Cells and Both Processes are Regulated by Phlda1. *Cell Biochem Biophys* 2013.
- Mochizuki T, Furuta S, Mitsushita J, Shang W, Ito M, Yokoo Y, Yamaura M, Ishizone S, Nakayama J, Konagai A, Hirose K, Kiyosawa K, Kamata T (2006) Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* 25: 3699-3707.
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A (2008) Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 372: 449-456.
- Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano JP, Khayat D (2010) Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 74: 27-39.
- Müller A, Zang C, Chumduri C, Dörken B, Daniel PT, Scholz CW (2013) Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*.
- Naughton R, Quiney C, Turner SD, Cotter TG (2009) Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia* 23: 1432-1440.
- Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H (2012) Melanoma: New Insights and New Therapies. *Journal of Investigative Dermatology* 132: 854-863.
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396: 95-100.
- Nunez G, Benedict MA, Hu YM, Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245.
- Opel D, Westhoff MA, Bender A, Braun V, Debatin KM, Fulda S (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 68: 6271-6280.

- Osman B, Doller A, Akool el S, Holdener M, Hintermann E, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2009) Rapamycin induces the TGFbeta1/Smad signaling cascade in renal mesangial cells upstream of mTOR. *Cell Signal* 21: 1806-1817.
- Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P, Ahidouch A, Joury N, Prevarskaya N (2004) Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C125-C134.
- Pacheco I, Buzea C, Tron V (2011) Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13.
- Paez J, Sellers WR (2003) PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* 115: 145-167.
- Panner A, Parsa AT, Pieper RO (2006) Use of APO2L/TRAIL with mTOR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther* 6: 1313-1322.
- Peramo A, Marcelo CL (2013) Visible effects of rapamycin (sirolimus) on human skin explants in vitro. *Arch Dermatol Res* 305: 163-171.
- Pitti RM, Marsters MA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry* 271: 12687-12690.
- Plötz M, Gillissen B, Hossini AM, Daniel PT, Eberle J (2012) Disruption of the VDAC2-Bak interaction by Bcl-xS mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death and Differentiation* 19: 1928-1938.
- Pop C, Salvesen GS (2009) Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 284: 21777-21781.
- Pópulo H, Lopes JM, Soares P (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 13: 1886-1918.
- Qu J, Zhao M, Teng Y, Zhang Y, Hou K, Jiang Y, Yang X, Shang H, Qu X, Liu Y (2011) Interferon-alpha sensitizes human gastric cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via activation of the c-CBL-dependent MAPK/ERK pathway. *Cancer Biol Ther* 12: 494-502.
- Quast SA, Berger A, Buttstadt N, Friebe K, Schonherr R, Eberle J (2012) General Sensitization of Melanoma Cells for TRAIL-Induced Apoptosis by the Potassium Channel Inhibitor TRAM-34 Depends on Release of SMAC. *Plos One* 7.
- Raisova M, Hossini A, Riebeling C, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC (2001) Apoptosis resistance in human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* 117: 168.
- Renault TT, Manon S (2011) Bax: Addressed to kill. *Biochimie* 93: 1379-1391.

- Reuland SN, Goldstein NB, Partyka KA, Smith S, Luo Y, Fujita M, Gonzalez R, Lewis K, Norris DA, Shellman YG (2012) ABT-737 synergizes with Bortezomib to kill melanoma cells. *Biol Open* 1: 92-100.
- Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1: 1458-1461.
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun CH, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800.
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME (2011) Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17: 4550-4557.
- Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S, Keen SL, Rowland K, Seiden IM, Thornberry NA, Nicholson DW (2001) Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6132-6137.
- Ruggieri P, Mangino G, Fioretti B, Catacuzzeno L, Puca R, Ponti D, Miscusi M, Franciolini F, Ragona G, Calogero A (2012) The Inhibition of KCa3.1 Channels Activity Reduces Cell Motility in Glioblastoma Derived Cancer Stem Cells. *Plos One* 7.
- Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S (2007) Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 46: 383-393.
- Sachsenmaier C (2001) Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie* 24: 346-355.
- Sadidi M, Lentz SI, Feldman EL (2009) Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie* 91: 577-585.
- Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 401-410.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005a) Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 596-603.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22: 159-168.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005b) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
- Sassi N, De Marchi U, Fioretti B, Biasutto L, Gulbins E, Franciolini F, Szabo I, Zoratti M (2010) An investigation of the occurrence and properties of the mitochondrial intermediate-

- conductance Ca(2+)-activated K(+) channel mtK(Ca)3.1. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1260-1267.
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225.
- Schmidt J, Friebel K, Schonherr R, Coppolino MG, Bosserhoff AK (2010) Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels. *Cell Res* 20: 1224-1238.
- Schonherr R (2005) Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *Journal of Membrane Biology* 205: 175-184.
- Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Gassner B, Schulz C, Kessler W, Mally S, Romer M, Stock C (2012) Dynamic redistribution of calcium sensitive potassium channels (hKCa3.1) in migrating cells. *Journal of Cellular Physiology* 227: 686-696.
- Schwab A, Reinhardt J, Schneider SW, Gassner B, Schuricht B (1999) K⁺ channel-dependent migration of Fibroblasts and human melanoma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 9: 126-132.
- Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS (2005) XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *Embo Journal* 24: 645-655.
- Sen P, Mukherjee S, Ray D, Raha S (2003) Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Mol Cell Biochem* 253: 241-246.
- Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Forro L, Schlegel W, Krause KH (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochemical Journal* 406: 105-114.
- Shen ZJ, Esnault S, Schinzel A, Borner C, Malter JS (2009) The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 facilitates cytokine-induced survival of eosinophils by suppressing Bax activation. *Nature Immunology* 10: 257-265.
- Shi YG (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9: 459-470.
- Sinnberg T, Lasithiotakis K, Niessner H, Schitteck B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, Campos M, Gogel J, Garbe C, Meier F (2009) Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *J Invest Dermatol* 129: 1500-1515.
- Smalley KSM, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M (2006) Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 1136-1144.
- Soengas MS, Lowe SW (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22: 3138-3151.
- Song G, Chen GG, Hu T, Lai PBS (2010) Bid Stands at the Crossroad of Stress-Response Pathways. *Current Cancer Drug Targets* 10: 584-592.

- Soria JC, Mark Z, Zatloukal P, Szima B, Albert I, Juhasz E, Pujol JL, Kozielski J, Baker N, Smethurst D, Hei YJ, Ashkenazi A, Stern H, Amler L, Pan Y, Blackhall F (2011) Randomized Phase II Study of Dulanermin in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 29: 4442-4451.
- Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A (2012) Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine* 366: 707-714.
- Srivastava RK (2001) TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 3: 535-546.
- Stiles BL (2009) PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 1276-1282.
- Sully K, Akinduro O, Philpott MP, Naeem AS, Harwood CA, Reeve VE, O'Shaughnessy RF, Byrne C (2012) The mTOR inhibitor rapamycin opposes carcinogenic changes to epidermal Akt1/PKB? isoform signaling. *Oncogene* 338.
- Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S, Rikiishi H (2011) Rapamycin suppresses ROS-dependent apoptosis caused by selenomethionine in A549 lung carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 67: 1129-1136.
- Szabo I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Gulbins E (2008) Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14861-14866.
- Szabo I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E (2005) A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 280: 12790-12798.
- Tait SWG, Green DR (2008) Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27: 6452-6461.
- Tait SWG, Green DR (2010a) Cell survival in tough times The mitochondrial recovery plan. *Cell Cycle* 9: 4254-4255.
- Tait SWG, Green DR (2010b) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 621-632.
- Tanaka S, Sugimachi K, Shirab K, Shimada M, Wands JR (2000) Expression and antitumor effects of TRAIL in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 32: 523-527.
- Tinel A, Tschopp J (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304: 843-846.

- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B-Cells with the T(14-18) Chromosome-Translocation. *Science* 226: 1097-1099.
- Upton JP, Valentijn AJ, Zhang L, Gilmore AP (2007) The N-terminal conformation of Bax regulates cell commitment to apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 14: 932-942.
- Vaculova A, Kaminsky V, Jalalvand E, Surova O, Zhivotovsky B (2010) Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL. *Mol Cancer* 9: 1-13.
- Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P (2010) Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death and Differentiation* 17: 922-930.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 700-714.
- Vaux DL, Silke J (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 499-504.
- Verbon EH, Post J.A., Boonstra J. (2012) The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 511: 1-6.
- Verhagen AM, Vaux DL (2002) Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 7: 163-166.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2005) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* 84: 627-639.
- Vijapurkar U, Robillard L, Zhou S, Degtyarev M, Lin K, Truong T, Tremayne J, Ross LB, Pei Z, Friedman LS, Blackwood EM, Belvin M (2012) mTOR kinase inhibitor potentiates apoptosis of PI3K and MEK inhibitors in diagnostically defined subpopulations. *Cancer Lett* 326: 168-175.
- Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 489-501.
- Vogler M, Walczak H, Stadel D, Haas TL, Genze F, Jovanovic M, Bhanot U, Hasel C, Moller P, Gschwend JE, Simmet T, Debatin KM, Fulda S (2009) Small Molecule XIAP Inhibitors Enhance TRAIL-Induced Apoptosis and Antitumor Activity in Preclinical Models of Pancreatic Carcinoma. *Cancer Research* 69: 2425-2434.
- Vogt C (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians). Verlag Jent und Gassman 130.
- Vulpetti A, Bosotti R (2004) Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Farmaco* 59: 759-765.

- Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH (2000) 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.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JCL, Lynch DH (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Medicine* 5: 157-163.
- Wang QH, Sun SY, Khuri F, Curran WJ, Deng XM (2010a) Mono- or Double-Site Phosphorylation Distinctly Regulates the Proapoptotic Function of Bax. *Plos One* 5.
- Wang S (2010) TRAIL: a sword for killing tumors. *Curr Med Chem* 17: 3309-3317.
- Wang S, Ren W, Liu J, Lahat G, Torres K, Lopez G, Lazar AJ, Hayes-Jordan A, Liu K, Bankson J, Hazle JD, Lev D (2010b) TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. *Clin Cancer Res* 16: 2591-2604.
- Wang SL, El Deiry WS (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628-8633.
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29: 489-496.
- Wang ZH, Shen B, Yao HL, Jia YC, Ren J, Feng YJ, Wang YZ (2007) Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+) -activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene* 26: 5107-5114.
- Wen S, Zhu D, Huang P (2013) Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med Chem* 5: 53-67.
- Worzowa J, Koehrer S, Strommer S, Cejka D, Fuereder T, Zebedin E, Wacheck V (2011) Vertical Inhibition of the mTORC1/mTORC2/PI3K Pathway Shows Synergistic Effects against Melanoma In Vitro and In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 131: 495-503.
- Wickenden A (2002) K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther* 94: 157-182.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-682.
- Wipf P, Halter RJ (2005) Chemistry and biology of wortmannin. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3: 2053-2061.
- Wu XX, Kakehi Y (2009) Enhancement of lexatumumab-induced apoptosis in human solid cancer cells by Cisplatin in caspase-dependent manner. *Clin Cancer Res* 15: 2039-2047.
- Wulff H, Castle NA (2010) Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3: 385-396.
- Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001) Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276: 32040-32045.

- Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8151-8156.
- Wulff H, Zhorov BS (2008) K^{+} channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chem Rev* 108: 1744-1773.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Xie X, White EP, Mehnert JM (2013) Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS One* 8.
- Xin MG, Deng XM (2006) Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 281: 18859-18867.
- Xu Y, Zhou LP, Huang J, Liu F, Yu J, Zhan QM, Zhang L, Zhao XH (2011) Role of Smac in Determining the Chemotherapeutic Response of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 17: 5412-5422.
- Yao C, Liu J, Shao L (2011a) Rapamycin inhibits the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by down regulating the expression of survivin. *Hepatogastroenterology* 58: 1075-1080.
- Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K (2011b) Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 364: 514-523.
- Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 47-59.
- Younes A, Vose JM, Zelenetz AD, Smith MR, Burris HA, Ansell SM, Klein J, Halpern W, Miceli R, Kumm E, Fox NL, Czuczman MS (2010) A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Cancer* 103: 1783-1787.
- Zhang LD, Fang BL (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy* 12: 228-237.
- Zhang XD, Wu JJ, Gillespie S, Borrow J, Hersey P (2006) 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. *Clinical Cancer Research* 12: 1355-1364.
- Zhang XD, Zhang XY, Gray CP, Nguyen T, Hersey P (2001) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res* 61: 7339-7348.

Zhang Y, Zhang B (2008) TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res* 6: 1861-1871.

Ziegler DS, Kung AL (2008) Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Current Opinion in Oncology* 20: 97-103.

Anhang

Auswahl an klinische Studien zum malignen Melanom

1.) MSD MK-3475

Randomized, Phase II study of the PD-1 inhibitor MK-3475 versus chemotherapy in patients with advanced melanoma

2.) GSK BRF115532 - COMBI-AD

Randomisierte, doppelblinde Phase III-Studie zur Dabrafenib in Kombination mit Trametinib im Vergleich zu zwei Placebos bei der adjuvanten Behandlung des Hochrisiko-Melanoms mit BRAF-V600-Mutation nach chirurgischer Resektion

3.) Roche GO28141 co-BRIM

A Phase III, double-blind, placebo-controlled study of vemurafenib + placebo versus vemurafenib in combination with GDC-0973 (MEK-inhibitor) in previously untreated BRAFV600-mutation positive patients with unresectable locally advanced or metastatic melanoma

4.) Roche GO27826

A Phase III, randomized, double blind, placebo-controlled study of vemurafenib (RO5185426) adjuvant therapy in patients with surgically resected, cutaneous BRAF-mutant melanoma at high risk for recurrence

5.) BMS IMAGE

A multi-national, prospective, observational study in patients with unresectable or metastatic melanoma

6.) ROCHE ZESS

A prospective safety study of patients with BRAFV600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma treated with vemurafenib.

7.) AB Science AB08026

A prospective, multicenter, randomized, open-label, active-controlled, two-parallel groups, phase 3 study to compare the efficacy and safety of masitinib at 7.5 mg/kg/day to dacarbazine in the treatment of patients with non-resectable or metastatic stage 3 or stage 4 melanoma carrying a mutation in the juxta membrane domain of c-kit

8.) ADO - Sentinel Studie

Kontrollierte und prospektiv randomisierte Therapiestudie zum Vergleich einer radikalen Lymphadenektomie versus Beobachtung bei Patienten mit malignem Melanom >1,0 mm Tumordicke und positivem Wächter-Lymphknoten

9.) GSK MEK116513 - COMBI-v

A Phase III, randomised, open-label study comparing the combination of the BRAF inhibitor, dabrafenib, and the MEK inhibitor, trametinib, to the BRAF inhibitor vemurafenib in subjects with unresectable (Stage IIIc) or metastatic (Stage IV) BRAF V600E/K mutation positive cutaneous melanoma

10.) GSK PRAME

An open, dose-escalation Phase I/II study to assess the safety, immunogenicity and clinical activity of recPRAME + AS15 Antigen-Specific Cancer Immunotherapeutic as first-line treatment of patients with PRAME-positive metastatic melanoma

11.) ROCHE BRAIN-METS

An open-label, single-arm phase II, multicenter study to evaluate the efficacy of Vemurafenib in patients with brain metastases.

12.) GSK MEK115306 - COMBI-d

Randomisierte, doppelblinde Studie der Phase III zum Vergleich der Kombination des BRAF-Hemmers Dabrafenib und des MEK-Hemmers Trametinib mit Dabrafenib und Placebo als First-Line-Therapie bei Patienten mit nicht resezierbarem (Stadium IIIC) oder metastasiertem (Stadium IV) kutanen Melanom mit BRAF-V600E/K-Mutation

13.) GSK MEK114267

A phase III randomized, open-label study comparing GSK1121212 to chemotherapy in subjects with advanced or metastatic BRAF V600E/K mutation-positive melanoma

14.) DeCOG-MM-PAL11

The IPI - Multibasket Trial in advanced uveal melanoma: Prospective clinical phase II multibasket study in Melanoma patients with advanced disease

15.) ADO ChemoSensMM

Prospectively randomized phase III study of an individualized sensitivity-directed combination chemotherapy versus DTIC as first-line treatment in stage IV metastatic melanoma

16.) ROCHE MO25515

An open-label, multicenter expanded access study of RO5185426 in patients with metastatic melanoma

17.) BMS CA 184-029

Adjuvant immunotherapy with anti-CTLA-4 monoclonal antibody (ipilimumab) versus placebo after complete resection of high-risk Stage III melanoma: a randomized, double-blind Phase III trial of the EORTC Melanoma Group

18.) GSK Predict

Predictive gene signature fore REsponse to recMAGE-A3 in unresecteD metastatIc CuTaneous melanoma Recombinant MAGE-A3 protein (recMAGE-A3) combined with the AS15 immunological Adjuvant System

19.) GSK Derma

A double-blind, randomized, placebo-controlled phase III study to assess the efficacy of recMAGE-A3+AS15 ASCI as adjuvant therapy in patients with MAGE-A3 positive resected stage III melanoma

20.) BMS CA 184-025

a multicenter, open-label, phase II study of Ipilimumab (MDX-010) extended-treatment Monotherapy or follow-up for patients previously enrolled in Ipilimumab (MDX-010) protocols

21.) BMS CA 184-024

a multicenter, randomized, double-blind, two-arm, phase III Study in Patients with untreated stage III (unresectable) or IV Melanoma receiving Dacarbazine plus 10 mg/kg of Ipilimumab (MDX-010) vs. Dacarbazine with placebo.

Überblick klinischer Studien mit PI3K-Akt/PKB-mTOR Inhibitoren
(Foster et al., 2012).

Compound	Company	Target	Status	Indications
PI3K inhibitors				
XL147	Exelixis/Sanofi	PI3K	Phase III	Solid tumors/lymphoma
PX-866	Oncocyte	PI3K	Phase III	Solid tumors
GDC0941	Genentech/Roche	PI3K	Phase I	Solid tumors/non-Hodgkin lymphoma
BKM120	Novartis	PI3K	Phase III	Solid tumors/leukemia
ZSTK474	Zenyaku Kogyo	PI3K	Phase I	Neoplasms
GS-1101 (CAL-101)	Gilead	PI3K δ	Phase II	Non-Hodgkin lymphoma/leukemia/allergic rhinitis
BYL719	Novartis	PI3K α	Phase I	Solid tumors
INK1117	Intellikine	PI3K α	Phase I	Solid tumors
IPI-145	Infinity	PI3K α/γ	Phase I	Advanced hematologic malignancies
Akt inhibitors				
Perifosine	Keryx	Akt	Phase III	Colorectal cancer/multiple myeloma
MK2206	Merck	Akt	Phase III	Solid tumors
PI3K/mTOR inhibitors				
BEZ235	Novartis	PI3K/mTOR	Phase III	Solid tumors
BAY80-6946	Bayer	PI3K/mTOR	Phase I	Neoplasms
BGT226	Novartis	PI3K/mTOR	Phase I	Solid tumors
XL765	Exelixis/Sanofi	PI3K/mTOR	Phase I	Solid tumors
SF1126	Semafore Pharma	PI3K/mTOR	Phase I	Solid tumors/multiple myeloma
GSK2126458	GSK	PI3K/mTOR	Phase I	Solid tumors
PF-04691502	Pfizer	PI3K/mTOR	Phase III	Solid tumors
GDC-0980	Genentech/Roche	PI3K/mTOR	Phase III	Solid tumors/non-Hodgkin's lymphoma/renal carcinoma
PKI-587	Pfizer	PI3K/mTOR	Phase I	Neoplasms
mTOR inhibitors				
OSI-027	OSI Pharma	mTOR/catalytic site	Phase I	Solid tumors/lymphoma
AZD8055	AstraZeneca	mTOR/catalytic site	Phase III	Solid tumors/lymphoma
INK128	Intellikine	mTOR/catalytic site	Phase I	Solid tumors/multiple myeloma
Ridaforolimus	Ariad/Merck	mTORC1	Phase III	Metastatic soft-tissue and bone sarcomas
Everolimus	Novartis	mTORC1	Approved	Renal cell carcinoma/neuroendocrine tumors/subependymal giant cell astrocytoma
Temsirolimus	Wyeth	mTORC1	Approved	Renal cell carcinoma
SHIP-1 activator				
AQX-1125	Aquinox	SHIP-1	Phase II	Airway inflammation

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
μM	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
α -Toco	α -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
B	
bp (kb)	Base pair (kilo base pair)
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 _L	Bcl-2-like 1 long
Bcl-x _S	Bcl-2-like 1 short
Bcl-x _{AK}	Bcl-2-like 1 atypical killer
Bcr-Abl	Fusionsgen auf Chromosom 22
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 interagting mediator of cell death
BK	Big Potassium conductance channel
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	Cellulary inhibitor of apoptosis

c-Kit	Tyrosinkinase, Stammzellfaktor-Rezeptor
CrmA	Cytokine response modifier A
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
CTX	Charybdotoxin
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
DMRIE-C	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammoniumbromid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNS	Desoxynukleinsäure
DR	Death receptor
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTIC	Dacarbazine
DTT	Dithiothreitol
E	
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
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
F	
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
FoxO	Forkhead-Box-Protein
FSC	Forward scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat)
G	
g	Gramm
GAPDH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase-3-beta
GYGD-Motiv	Glycin-Tyrosin-Glycin-Aspartat Motiv
H	
H ⁺	Wasserstoff-Proton
h	Stunde

HDACi	Histondeacetylase-Inhibitoren
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradishperoxidase)
HtrA2/Omi	High temperature requirement A2
H ₂ DCFDA	2-, 7-dichlorodihydrofluoresceindiacetat
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
I	
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IBM	IAP-binding motif
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
IFN- α	Interferon alpha
Ig	Immunglobulin
IK	Intermediate potassium conductance
I- κ B	Inhibitor of κ B proteins
IL-2	Interleukin-2
IMM	innere Mitochondrienmembran
J	
JAK	Januskinase
JNK	C-Jun N-terminal kinase
K	
kDa	Kilodalton
L	
l	Liter
LC3	Autophagosome-associated protein light chain 3
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LRR	Leucin-rich repeats
M	
mAb	Monoclonal antibody
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukaemia sequence-1
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Proton
min	Minute
Mito	Mitochondriale Fraktion
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
mt	mitochondrial
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC	mammalian Target of Rapamycin-Complex
N	
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von NADP
Nbk/Bik	Natural born killer/Bcl-2-interakting killer
NDPK-3	Nucleoside diphosphate kinase-3
NF- κ B	Nuclear factor ' κ -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	
p35	p35 - baculovirus encoded inhibitor
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
PE	Phycoerythrin
PH-Domäne	Plekstrin homology-Domäne
pH	Potentia hydrogenii
PI	Propidium iodide
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
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
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
Q	
Q-VD-Oph	Peptid: Quinoline-Valine-Aspartic-CH ₂ -O-Phenyl
R	
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma
REST	Repressor element-1 silencing transcription factor
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIP	Receptor-interacting protein
RING	Really interesting new gene
RGP	Radial Growth Phase
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species - reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur

RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
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
SH2-Domäne	Src-homology 2-Domäne
SHIP	SH2-domain containing inositol 5-phosphatase
siRNS	small interfering RNA
SK	Small Potassium conductance
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
SRC	Rous Sarcoma virus transforming oncogene
SSC	Side scatter
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
STAT	Signal Transducers and activators of Transcription
T	
tBid	Truncated Bid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TM	Transmembrane domain
TMRM ⁺	Tetramethylrhodamine methylester perchlorate
TNF- α	Tumour necrosis factor alpha
TNF-R	TNF receptor
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
TRAM-34	(1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol
Tris	Tris-[hydroxymethyl]amino-methane
TBS	Tris-buffered saline
U	
UBA	Ubiquitin-associated
UBC	Ubiquitin-conjugation domain
V	
V	Volt
VDAC	Voltage dependent anion channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor
VGP	Vertical Growth Phase
W	
WST	Water Soluble Tetrazolium

X

XAF1

XIAP-associated factor

XIAP

X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

Z

z.B.

zum Beispiel

z-VAD-fmk

Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationsliste

General sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC.

Quast SA, Berger A, Buttstädt N, Friebel K, Schönherr R, Eberle J.
PloS One 2012; 7(6): e39290

ROS and phosphorylation of Bax are essential steps in sensitizing melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the kinase inhibitor Wortmannin

Quast SA, Berger A, Eberle J.
Cell Death and Disease, 2013 [manuscript in revision]

Bax phosphorylation is the essential steps in sensitizing melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the mTOR-kinase inhibitor Rapamycin.

Quast SA, Plötz M, Berger A, Eberle J.
J Invest Dermatol, 2013 [manuscript in preparation]

RAF inhibition overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in melanoma cells

Berger A, Quast SA, Plötz M, Trefzer U, Eberle J.
J Invest Dermatol, 2013 [manuscript in revision]

Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by BMS-345541 is associated with BAX activation and altered phosphorylation

Berger A, Quast SA, Plötz M, Kammermeier A, Eberle J.
Cell Death and Disease 2013; Jan 24;4:e477.

Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative - Enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways.

Berger A, Quast SA, Plötz M, Hein M, Kunz M, Langer P, Eberle J.
Biochem Pharmacol. 2011 Jan 1; 81(1):71-8

The BH3-only protein BimL overrides Bcl-2-mediated apoptosis resistance in melanoma cells.

Plötz M, Gillissen B, Quast SA, Berger A, Daniel PT, Eberle J.
Cancer Lett. 2013 Feb 9. doi:pii: S0304-3835(13)00116-X.

Loss of T-cadherin (CDH-13) regulates AKT signalling and desensitizes for apoptosis in melanoma.

Bosserhoff AK, Ellmann L, Quast SA, Eberle J, Boyle G, Kuphal S
Molecular Carcinogenesis 2013 [Manuscript accepted]

Kongressbeiträge

Kongresse

- 2012
 - Cancer Day 2012, Berlin
 - 30. Deutscher Krebskongress, Berlin (Postervortrag)
 - 39. Jahrestagung der ADF, Marburg

- 2011
 - 19th Annual Meeting of the ECDO, Stockholm, Schweden
 - 21. Jahrestagung der ADO, Weimar
 - 38. Jahrestagung der ADF, Tübingen

- 2010
 - 20. Jahrestagung der ADO, Kiel
 - 18th Annual Meeting of the ECDO, Ghent, Belgien
 - Joint Meeting of the German Society for Cell Biology and the German Melanoma Research Network, Regensburg (Postervortrag)
 - 29. Deutscher Krebskongress, Berlin (Präsidentenposter)

- 2009
 - 17th Annual Meeting of the ECDO, Paris, Frankreich

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Privat-Dozent Herrn Dr. Jürgen Eberle bedanken, der mir das Dissertationsthema zur Verfügung gestellt hat und für Anleitungen sowie in allen wissenschaftlichen Fragen immer zur Verfügung stand. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm auch für die kontinuierliche Unterstützung des Projektes, die stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragende Betreuung bedanken, die wesentlich zur Ausarbeitung dieser Arbeit beitrugen.

Bei Frau Professor Knaus bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für interessante Doktoranden-Symposien.

Herrn Dr. Lothar F. Fecker danke ich ganz besonders für seine Kollegialität, sein technisches Wissen und seine praktische Hilfestellung im Laboralltag und für spannende wissenschaftliche Diskussionen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Anja Berger für ihre technische und moralische Unterstützung bedanken. Außerdem danke ich Nadya Al-Yacoub, Frank Braun, Michael Plötz, Conny Schwarz, Katja Steinhorst und allen, die nicht persönlich genannt sind, für die nette Atmosphäre in der Gruppe und Hilfe im Labor.

Den Leuten vom Melanomverbund, insbesondere aber Frau Prof. Anja Bosserhof, Herrn PD Dr. Roland Schönherr, Frau PD Dr. Silke Kuphal, Nicole Buttstädt und Kristin Friebe für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung im Labor.

Meinen Eltern, Ute und Dietrich Quast, denen ich nicht genug mit Worten danken kann. Durch ihre bedingungslose und aufopfernde Unterstützung und ihre unermüdliche Geduld ermöglichten sie mir, meinen eigenen Weg zu finden. Danke, dass es euch gibt.

Ferner danke ich meinem Bruder Jonathan für seine Unterstützung und sein Interesse an meinem Arbeitsgebiet und meinen Großeltern, Elfriede und Horst Noack, dafür dass sie immer an mich geglaubt haben, immer stolz auf mich waren und mein Leben maßgeblich geprägt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Melanie Selka und Andreas Diezmann für das Korrekturlesen meiner Dissertation, für Anregungen, Aufmunterungen und immer ein liebes Wort. Marion Brudna, meiner Herzencousine, danke ich für den Beistand im Kampf gegen die Striche und im finalen Akt.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Mann Michael Quast, der mich immer und bedingungslos mit seiner Liebe unterstützt hat und mir in stressigen Zeiten ein Halt war. Danke, mein Herz, dass du an mich geglaubt und mir und meinem Können vertraut hast.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sandra-Annika Quast, geb. am 20.05.1977 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 im Fach Biochemie des Fachbereichs für Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 25. April 2013

Sandra-Annika Quast

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der Melanomprogression.	11
Abbildung 2: Die ABCD-Kriterien beim malignen Melanom.	12
Abbildung 3: Unterteilung des Melanoms in mehrere Haupttypen.	13
Abbildung 4: Vergleich zwischen einer apoptotischen (rechts) und nekrotischen (links) Zelle.	19
Abbildung 5: Hauptsignalwege der Apoptose.	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Familie der Bcl-2-Proteine.	23
Abbildung 7: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch proapoptotische Bcl-2-Proteine.	25
Abbildung 8: Funktion der Caspasen in humanen Zellen.	27
Abbildung 9: Caspasenaufbau.	28
Abbildung 10: Prozessierung von Initiator- und Effektorcaspasen.	29
Abbildung 11: Schematische Darstellung verschiedener Mitglieder der IAP-Proteinfamilie.	31
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Mechanismus zur Caspaseinhibition.	32
Abbildung 13: Todesliganden und ihre Rezeptoren.	35
Abbildung 14: Der PI3K-Akt/PKB-mTOR Signalweg.	42
Abbildung 15: Die Familie der PI3-Kinasen.	42
Abbildung 16: Aktivierungsmechanismus von Akt/PKB.	43
Abbildung 17: Chemische Strukturen der PI3K-Akt/PKB-mTOR-Signalwegsinhibitoren.	46
Abbildung 18: Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal KCa3.1.	48
Abbildung 19: Die Bindung von TRAM-34 an den KCa3.1.	52
Abbildung 20: Nachweis von KCa3.1-Kanälen in Melanomzelllinien.	55
Abbildung 21: Antiproliferative Effekte von TRAM-34.	56
Abbildung 22: Durchlichtbilder zur Apoptoseinduktion in A-375 und Mel-HO Zellen.	57
Abbildung 23: Sensitivierung von Melanomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose.	58
Abbildung 24: Bisbenzimid-Färbung von A-375 und A-375-TS Zellen.	58
Abbildung 25: Auswirkungen von TRAM-34/TRAIL auf die Proliferation.	59
Abbildung 26: Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose durch TRAM-34.	60
Abbildung 27: Die Rolle von KCa3.1 in der TRAIL-induzierten Apoptose.	61
Abbildung 28: Die Rolle von Ca ²⁺ in der TRAM-vermittelten Apoptose.	62
Abbildung 29: Synergismus-Studien zu TRAM-34 und TRAIL.	63
Abbildung 30: Effekte von TRAM-34 auf die TRAIL-Rezeptoren.	64
Abbildung 31: Der Effekt von TRAM-34 auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren.	65
Abbildung 32: Caspasen-Aktivierung nach Behandlung mit TRAM-34 und TRAIL.	66
Abbildung 33: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges.	67
Abbildung 34: Expression der Bcl-2 Proteine in Abhängigkeit von TRAM/TRAIL.	68
Abbildung 35: Abhängigkeit der TRAM/TRAIL-induzierten Apoptose von Bax.	69
Abbildung 36: Überexpression von Bcl-2 blockiert die TRAM/TRAIL-induzierte Apoptose.	70
Abbildung 37: Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien.	71
Abbildung 38: Nachweis der Bindung von KCa3.1 an Bax.	72
Abbildung 39: Direkte Verbindung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg über Bid.	73
Abbildung 40: Bedeutung der IAPs für die verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose durch TRAM-34.	74
Abbildung 41: Die entscheidende Rolle von SMAC.	75
Abbildung 42: Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mit Wortmannin.	77
Abbildung 43: Keine Aktivierung der Caspasen-Kaskade durch Wortmannin/TRAIL.	78
Abbildung 44: Erhöhte Produktion von ROS durch Behandlung mit Wortmannin.	79
Abbildung 45: Aktivierung des proapoptotischen mitochondrialen Signalweges.	81
Abbildung 46: Blockierung der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose durch exogenes Bcl-2.	82
Abbildung 47: Die Rolle von Bax in der Wortmannin/TRAIL-induzierten Apoptose.	84
Abbildung 48: Aktivierung von Bax durch Wortmannin.	85
Abbildung 49: Wortmannin beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von Bax.	86
Abbildung 50: Modell zur Sensitivierung von Melanomzellen durch Wortmannin.	88
Abbildung 51: Antiproliferative Effekte von Rapamycin.	90
Abbildung 52: Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mit Rapamycin.	92
Abbildung 53: Keine Aktivierung der Caspasenkaskade, der TRAIL-Rezeptoren, der Bcl-2-Proteine und der cIAPs durch Rapamycin/TRAIL.	94
Abbildung 54: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und ROS.	95
Abbildung 55: Die Rolle von Bcl-2 in der Rapamycin-verstärkten Apoptose.	97
Abbildung 56: Bax in der Rapamycin/TRAIL-induzierten Apoptose.	98
Abbildung 57: Rapamycin beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von Bax.	99
Abbildung 58: Optischer Aufbau eines FACSCalibur Durchflusszytometers.	119
Abbildung 59: Prinzip des Cell Death Detection ELISA Assays.	121
Abbildung 60: Prinzip des Cytotoxicity Detection Assays.	123
Abbildung 61: Prinzip des WST-1 Cell proliferation Assays.	124
Abbildung 62: BCA-Nachweismethode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen.	128