

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression und Wechselwirkungen von Regulatoren der
Apoptose in humanen Melanozyten und Melanomzellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Susanne Lenkeit
aus Berlin/ Deutschland

Berlin 2010

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Eberle
 2. Prof. Dr. med. W. Harth
 3. Priv.-Doz. Dr. A. Paschen

Datum der Promotion: 19. November 2010

Anfangs wollt ich fast verzagen,
Und ich glaubt, ich trüg es nie;
Und ich hab es doch getragen-
Aber fragt mich nur nicht, wie?

Heinrich Heine

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Melanozyten und Melanome.....	1
1.2	Therapieansätze beim malignen Melanom.....	2
1.3	Apoptose.....	4
1.3.1	Apoptose - Programmierter Zelltod	4
1.3.2	Caspasen - Proteasen der Apoptose	7
1.3.3	Signalwege der Apoptose	10
1.3.3.1	extrinsischer Signalweg.....	10
1.3.3.2	intrinsischer Signalweg.....	13
1.4	Regulatoren der Apoptose	14
1.4.1	Bcl-2 (<i>B-cell lymphoma-2</i>)-Proteine	15
1.4.2	p53	16
1.4.3	AIF	16
1.4.4	NF-κB.....	18
1.4.5	Stickstoffmonoxid (NO)	19
1.4.6	Apoptose inhibierende Proteine - IAPs	21
1.4.7	FLIP	26
1.4.8	Smac.....	27
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	28
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Geräte	29
2.1.2	Verbrauchsmaterial	29
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Enzyme	30
2.1.4	Apoptosestimulanzen	32
2.1.5	Antikörper.....	32
2.1.6	Zellkulturen.....	33
2.1.7	Nährmedien.....	33
2.1.8	Lösungen und Puffer.....	34

2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellkulturen.....	35
2.2.2	Stabil transfizierte Melanomzellen.....	35
2.2.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	36
2.2.4	Zytotoxizitätsassay	37
2.2.5	Apoptoseassay.....	38
2.2.6	Proteinextraktion	39
2.2.7	Proteinbestimmung	40
2.2.8	Elektrophoretisches Verfahren (SDS-Protein-Gelelektrophorese)	40
2.2.9	Western-Blot	42
2.2.10	Antikörperinkubation	42
2.2.11	statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Einfluss von CH-11, TNF-α, IFN-γ und LPS auf die Apoptose von Melanozyten und Melanomzellen.....	45
3.1.1	Verdopplung der Apoptose in Melanozyten durch Stimulation mit CH-11 .	46
3.1.2	Starke Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch Stimulation mit IFN- γ , LPS und TNF- α in Kombination.....	48
3.1.3	Verlust der Sensitivität für CH-11 und TNF- α im Tet-On-Zellklon SKM13-CD95L.....	50
3.2	Expressionsanalyse von Regulatoren der Apoptose in Melanozyten und Melanomzellen.....	52
3.2.1	Verstärkte Expression von XIAP in Melanomzellen	52
3.2.2	Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien	54
3.2.3	Erhöhte cIAP2-Expression in Melanomzelllinien	55
3.2.4	Erhöhte Expression von Survivin in Melanomzellen.....	57
3.2.5	Livin-Expression nur in einigen Melanomzelllinien.....	59
3.2.6	Keine FLIP-Expression in Melanozyten	60
3.2.7	Expression von Smac in Melanozyten und Melanomzelllinien	62
3.2.8	Reduzierte Expression von AIF in Melanomzellen	63
3.2.9	Gegenläufige Expression von AIF und Smac in den Melanomzelllinie MeWo und SK-Mel-13.....	65
3.3	Expressionsanalyse von Regulatoren der Apoptose in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den stabilen Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L	66
3.3.1	Keine Veränderungen der Expression von XIAP und cIAP1	66

3.3.2	Gesteigerte cIAP2-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten.....	67
3.3.3	Gesteigerte Survivin-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten	68
3.3.4	Schwache Livin-Expression in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 sowie deren Transfektanten	70
3.3.5	Verlust der FLIP-Expression in den SK-Mel-13-Transfektanten.....	71
3.3.6	Unveränderte Smac-Expression nach Transfektion und Behandlung mit CH-11 , TNF- α und Doxycyclin.....	71
3.3.7	Gesteigerte AIF-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten	72
3.4	Metaanalyse der anti- und proapoptotischen Proteine in Melanozyten und Melanomzelllinien	73
3.4.1	Stärkere Expression proapoptotischer Proteine in Melanomzelllinien.....	73
3.4.2	Gesteigerte Expression antiapoptotischer Proteine durch CH-11	75
3.4.3	Veränderte Proteinexpression in SK-Mel-13-Transfektanten	75
4	Diskussion	77
4.1	Die Bedeutung von FLIP für die Apoptosesensitivität in Melanomzellen.....	78
4.2	Hohe Livin-Expression in Mel-2a und MeWo korreliert mit niedriger Smac-Expression	80
4.3	AIF-Antagonismus von Survivin könnte Ursache einer reduzierten AIF-Expression in Melanomzellen sein	81
4.4	Negative Korrelation zwischen Survivin- und Smac-Expression	83
4.5	Gleichförmig verminderte AIF-Expression korreliert nicht mit der Todesliganden-Sensitivität von Melanomzellen	85
4.6	Expressionsveränderungen pro- und antiapoptotischer Proteine in stabil mit CD95L transfizierten Zellklonen	86
4.7	CH-11 führt zur gesteigerten Expression und Spaltung antiapoptotischer Proteine.....	88
4.8	In Melanozyten Hemmung der IAPs durch iNOS möglich	89
4.9	Ausblick.....	90
5	Zusammenfassung	92
5.1	Zusammenfassung.....	92
5.2	Summary.....	94
6	Literaturverzeichnis	96
7	Abkürzungsverzeichnis	114
8	Selbstständigkeitserklärung	118
9	Danksagung.....	119

1 Einleitung

1.1 Melanozyten und Melanome

Melanozyten sind zur Melaninbildung befähigte Zellen in der epidermalen Basalschicht, die aber auch in der Schleimhaut (Mukosa), der Aderhaut (Choroidea) und den Hirnhäuten (Meningen) vorkommen (Riede und Schaefer, 1999). Der von ihnen ausgehende Tumor ist das maligne Melanom (gr. melan, schwarz; gr. -om, Geschwulst), das sich durch eine hohe lymphogene und hämatogene Metastasierungsrate auszeichnet (McGovern et al., 1986; Schuchter, 2001).

Die Inzidenz ist durch höhere Sonnenbelastung und zunehmendes Lebensalter steigend. Aktuell liegt die Inzidenz in Mitteleuropa bei ca. 10/100 000, in Australien und den Südstaaten der USA bei 30-45/100 000 pro Jahr, wobei deutlich mehr Menschen mit weißer als mit dunkler Hautfarbe betroffen sind. Im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen ist das maligne Melanom als Todesursache mit ca. 1% im Vergleich zur relativ geringen Inzidenz eher hoch. Der Rückgang der Sterblichkeit trotz steigender Inzidenz von Melanomen ist hauptsächlich auf die verbesserte Früherkennung zurückzuführen (Beddingfield, 2003).

Als besonderer Risikofaktor gilt, neben einer genetischen Prädisposition, die durch ein verändertes Freizeitverhalten bedingte intensive UV-Exposition der Haut und die damit einhergehende UV-induzierte Mutagenese.

Maligne Melanome werden nach der American Joint Committee on Cancer (AJCC) von 2001 klinisch in vier Stadien (I, II, III, IV) unterteilt. Die Stadien richten sich nach der Gesamttumordicke nach Breslow (Stadium I: Tumor < 1 mm, Stadium II: Tumor > 1 mm), sowie nach dem Auftreten von Metastasen (Stadium III: Regionale Lymphknoten-Metastasen, Stadium IV: Systemische Metastasen). Mit eingetretener Disseminierung der malignen Erkrankung sinkt die Überlebenserwartung der betroffenen Patienten drastisch. Die 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt von 88% in Stadium I auf 2,5% in Stadium IV (Balch et al., 2001) (siehe Tab. 1).

Pathologisches Stadium	T (Größe in mm)	N	M	10-Jahres-Überleben in %
IA	T1a (<1,0)	0	0	87,9
IB	T1b (<1,0)	0	0	83,1
	T2a (1,01-2,0)	0	0	79,2
IIA	T2b (1,01-2,0)	0	0	64,4
	T3a (2,01-4,0)	0	0	63,8
IIB	T3b (2,01-4,0)	0	0	50,8
	T4a (> 4,0)	0	0	53,9
IIC	T4b (> 4,0)	0	0	32,3
IIIA	Jedes T	N1a	0	63
	Jedes T	N2a	0	56,9
IIIB	Jedes T	N1a	0	37,8
	Jedes T	N2a	0	35,9
	Jedes T	N1b	0	47,7
	Jedes T	N2b	0	39,2
IIIC	Jedes T	N1b	0	24,4
	Jedes T	N2b	0	15
	Jedes T	N3	0	18,4
IV	Jedes T	Jedes N	M1a	15,7
	Jedes T	Jedes N	M1b	2,5
	Jedes T	Jedes N	M1c	6

Tab. 1: klinische Stadieneinteilung des malignen Melanoms. Nach Empfehlungen des American Joint Committee on Cancer (AJCC). Autoren: Balch et al., 2001.

1.2 Therapieansätze beim malignen Melanom

Der Behandlungserfolg des malignen Melanoms ist im Wesentlichen von der Früherkennung abhängig. Die Therapie erfolgt dann entsprechend dem Tumorstadium. Im Stadium des lokalen Tumors (I/II nach Breslow) erfolgt die chirurgische Entfernung mit entsprechendem Sicherheitsabstand (In situ: 0,5 cm; bei Tumordicke < 2 mm: 1 cm; bei Tumordicke > 2 mm: 2 cm). Ab einer Tumordicke von 1 mm wird zur Detektion von Mikrometastasen eine Lymphknotenbiopsie und ggf. eine Lymphadenektomie vorgenommen (Garbe, 2005). Bei erhöhtem Metastasierungsrisiko (Tumordicke >1,5 mm) wird eine adjuvante Therapie mit niedrigdosiertem Interferon-alpha (IFN- α) erwogen (Cameron et al., 2001). IFN- α ist die erste Substanz, die bei der Behandlung des malignen Melanoms zu signifikanten Vorteilen für die Behandelten führte (Asadullah et al., 2002). In einzelnen Studien konnte bei Lymphknotenmetastasen durch die adjuvante Behandlung mit IFN- α ein Überlebensvorteil gezeigt werden (Wheatley et al., 2002). Für fortgeschrittene Melanomstadien (Stadium IV) gibt es

bislang keine randomisierten Studien, die für eine gezielte Therapie einen Überlebensvorteil zeigen. Daher steht die Rückbildung der Tumore, mit Hilfe operativer Therapie, Radiotherapie oder systemischer Chemo- oder Immuntherapie, zur Verlängerung der beschwerdefreien Zeit und Linderung der Beschwerdesymptomatik, im Vordergrund (Garbe, 2005). Eine komplette Remission ist selten und somit die Entwicklung neuer Therapieansätze eine dringende Herausforderung.

Chemotherapeutika erreichen prinzipiell auch Metastasen, zeigten aber bisher keine signifikanten Erfolge (Soengas und Lowe, 2003). Dacarbazin (DTIC) ist aktuell das einzige beim Melanom zugelassene Chemotherapeutikum. Auch die Kombinationen von Chemotherapeutika und Zytokinen, wie IFN- α und/oder Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) zeigten keine klinisch relevanten Erfolge. Es ließ sich zwar eine Steigerung der objektiven Ansprechraten erzielen, die jedoch bei gesteigerter Toxizität nicht zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit führen konnte (Keilholz et al., 2005).

Neue Therapieansätze beruhen auf der Blockade molekularer Prozesse in der Signaltransduktion der Zelle. Es gibt erfolgversprechende Studien über eine Kombination eines klassischen Chemotherapeutikums mit Raf-Kinase-Inhibitoren wie beispielsweise Sorafenib sowie mit Proteasom-Inhibitoren wie z.B. Bortezomib (Strumberg, 2005; Amiri et al., 2004).

Jahrzehnte lang vermutete man die proliferative Aktivität eines Tumors als alleinigen Hauptfaktor seines Wachstums. Erst in den letzten beiden Jahrzehnten rückte die Apoptose als wachstumsregulierender Faktor in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Allgemein kann gesagt werden, dass Dysregulationen der Apoptosesignalwege zur Formation und zum Wachsen von Neoplasien beitragen und gegenüber immunologischen und zytotoxischen Therapien zu Resistenzen führen können (LaCasse et al., 1998; Eberle et al., 2007).

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieansätze sowie der Überwindung von Therapieresistenzen ist das molekularmedizinische Verständnis der Entwicklung von Resistenzen in Tumorzellen von großer Bedeutung. Obwohl das maligne Melanom nicht zu den großen Tumorentitäten zählt, stellt es aufgrund der breiten und fundierten klinischen und grundlagenwissenschaftlichen Datenlage einen Modelltumor dar, der immer mehr in den Fokus der modernen Therapieforschung rückte. Apoptose-modulierende Strategien sind hierbei von zentralem Interesse.

1.3 Apoptose

1.3.1 Apoptose - Programmierter Zelltod

Das Wort Apoptose setzt sich aus den griechischen Wörtern apo (ab, weg) und ptosis (Fall, Senkung) zusammen und bezeichnet einen physiologischen Prozess zur Eliminierung von Zellen, der bei der normalen Embryonalentwicklung, bei Immunfunktionen sowie bei der Aufrechterhaltung der Gewebemhomöostase beobachtet wird (Jacobson et al., 1997). Im Gegensatz hierzu steht die pathologische Nekrose, abgeleitet vom griechischen Wort nekrosis (Tod, Absterben).

Schon früh in der Geschichte der Biologie wurde der Zelltod als ein normaler Prozess im Leben eines multizellulären Organismus beschrieben. Die Regression larvaler und fetaler Strukturen im Laufe der Ontogenese wurde bereits im 2. Jahrhundert von Galenus Galen erwähnt (Krammer, 2000a). Die gezielte Erforschung von zellulären Degenerationsprozessen begann allerdings erst Mitte des 19. Jahrhunderts (Vogt, 1842). 1965 fand der „programmierte Zelltod“ erstmals Erwähnung, der Begriff „Apoptose“ wurde schließlich 1972 vom australischen Pathologen Kerr und seinen schottischen Kollegen Wyllie und Currie eingeführt (Lockshin und Williams, 1965; Kerr et al., 1972). Die Bedeutung der Apoptose wurde jedoch erst später deutlich, als man sie in Verbindung mit verschiedenen Krankheiten bringen konnte (Carson und Ribeiro, 1993).

Apoptose im Gegensatz zur Nekrose

Beim eukaryotischen Zelltod unterscheidet man grundsätzlich die pathologische Nekrose von der physiologischen Apoptose (Vermes und Haanen, 1994). Bei der Nekrose gehen Zellen infolge einer mechanischen Verletzung oder anderer irreparablen Schädigung (z.B. Ischämie, Hypoxie) zugrunde, so dass es zu einer Schwellung und anschließendem Platzen der Zelle kommt. Der Zellinhalt lockt Zellen des Immunsystems an und verursacht eine Entzündungsreaktion. Bei der Apoptose hingegen handelt es sich um einen physiologischen Selbstzerstörungsprozess. Er führt zur gewebeschonenden, selektiven Deletion von Einzelzellen sowie zur Abkapselung und Eliminierung ihrer DNA, schädlicher Zellinhaltsstoffe und potentiell gefährlicher Autoantigene. Im Unterschied zur Nekrose bleibt die Membranintegrität der Zelle als auch der Organellen während des gesamten Prozesses erhalten. Es kommt zur Volumenreduktion, Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung und durch

Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran Ausbildung „apoptotischer Körperchen“, die ein morphologisches Merkmal der Apoptose darstellen. Je nach Zellsystem dauert dieser Prozess insgesamt nur Minuten bis Stunden. In der Regel ruft die Apoptose keine Entzündungsreaktion hervor. Die Zellreste werden bei der Nekrose als auch der Apoptose von Makrophagen und den umgebenden Zellen phagozytiert (Paus et al., 1995) (siehe Abb. 1.1).

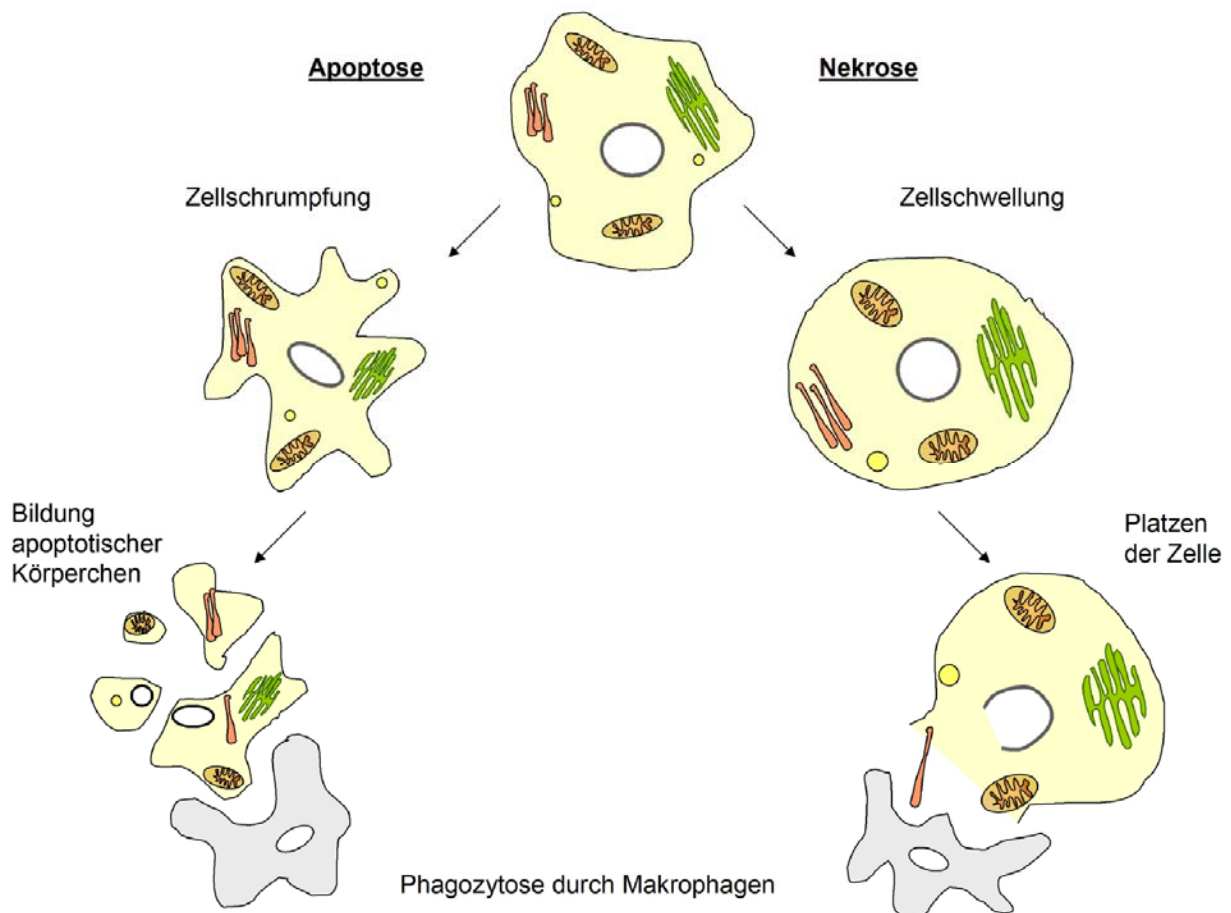


Abb. 1.1: Apoptose-Nekrose. Bei der Apoptose schrumpfen das Zytoplasma und der Zellkern. Die Zelle pumpt Ionen aus der Zelle und kontrahiert ihr Zytoskelett. Es kommt zur Chromatin-Kondensation und durch Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran zur Bildung „apoptotischer Körperchen“. Durch Membranveränderungen werden die Zellfragmente schließlich von Phagozyten erkannt und beseitigt. Bei der Nekrose kommt es zu einer veränderten Membranpermeabilität, die Ionenpumpen fallen aus, Kalium- und Natriumionen fließen in die Zelle ein und bringen die Zelle infolge der Osmose zum Platzen. Der Zellinhalt, der lysosomale Enzyme enthält, lockt Zellen des Immunsystems an, so dass eine Entzündungsreaktion folgt. Die Zellbestandteile werden durch Makrophagen eliminiert.

Zwischen der Nekrose und der Apoptose gibt es fließende Übergänge, wobei die Art des Zelltodes vom Zelltyp aber auch von der Intensität des Stimulus abhängt. So kann z.B. der Tumornekrosefaktor, wie der Name schon sagt, einerseits die Nekrose einleiten, in vielen Zelltypen aber auch die Apoptose induzieren. Ob eine Zelle

apoptotisch wird, hängt zusätzlich von inneren Faktoren ab, wie der Genaktivierung, dem Differenzierungsgrad und dem Stadium der Mitose.

Die Regulation der Apoptose ist ein komplexes Wechselspiel zwischen Apoptose-induzierenden und -supprimierenden Faktoren. Regulationsstörungen machen die Bedeutung für die Wahrung der Integrität eines vielzelligen Organismus deutlich. So können Gendefekte, die eine Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli bewirken, zu einer Akkumulation von Zellen führen, in dessen Folge Tumor- oder Autoimmunerkrankungen entstehen können (Vermeulen et al., 2005; Mahoney und Rosen, 2005). Eine gesteigerte Apoptose dagegen kann unter anderem neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson) verursachen (Canu und Calissano, 2003; Petit et al, 2005). Auch bei HIV-Infektion ist die Balance zugunsten des pro-apoptotischen Signalweges verändert. An der Immunabwehr beteiligte T-Lymphozyten werden durch Apoptose eliminiert und die Immunantwort damit unterdrückt (Gougeon, 2003).

Diese Tatsachen machen die Notwendigkeit des Verstehens der molekularen Abläufe und der Regulationsmechanismen der Apoptose für die molekulare Medizin verständlich.

Schematisch kann die Apoptose in eine Initiations-, Effektor- und Exekutionsphase eingeteilt werden. Die Initiationsphase ist die variabelste Phase. Durch physiologische Signale oder Stressinduktion wird in der Zelle der Zelltod eingeleitet, wobei Signalstärke, Zelltyp und Zustand der Zelle darüber entscheiden ob es auch wirklich dazu kommt. Wird ein gewisser Punkt des Signalweges überschritten, ist die Apoptose nicht mehr rückgängig zu machen. Dieser liegt, je nach Zelltyp, meist in der Effektorphase. Die Exekutionsphase läuft für die meisten Zellen ähnlich ab. Hier werden lebenswichtige Strukturen und Funktionen der Zelle verändert, so dass die morphologischen Charakteristika der Apoptose auftreten (Kroemer et al., 1997).

Abhängig vom initialen, pro-apoptotischen Reiz, der auf eine Zelle einwirkt, können verschiedene Signalwege aktiviert werden. Man unterscheidet dabei einen extrinsischen Signalweg, initiiert über Todesrezeptoren wie TNF- α und CD95 (Fas/APO-1), und einen intrinsischen Signalweg, der durch eine Schädigung der Mitochondrien initiiert wird (Daniel, 2000). Welcher Signalweg eingeschlagen wird, ist jedoch vom Zelltyp und Apoptose-induzierenden Stimulus anhängig. Die verschiedenen

Signalwege können auch gleichzeitig ablaufen oder alternativ induziert werden (Unal-Cevik et al., 2004).

1.3.2 Caspasen – Proteasen der Apoptose

Wichtige Hinweise für den Ablauf der Apoptose fand Hale 1996 bei Studien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Es konnten die Gene *ced* (*cell death gene*) -3, -4 und -9 isoliert werden (Hale et al., 1996). Mittels Screening-Verfahren fand man homologe humane Gene, die im menschlichen Organismus ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen. Homolog zu *ced-4* war *Apaf-1* (*Apoptotic protease-activating factor 1*), zu *ced-9* *bcl-2* (*B-cell lymphoma-2*) und zu *ced-3* eine ICE (*Interleukin 1 β -converting enzyme*)-ähnliche Protease (Zou et al., 1997; Yang und Korsmeyer, 1996). ICE-Proteasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum Cystein und besitzen eine Spaltungsspezifität für die Peptidbindung nach der Aminosäure Aspartat (Yuan et al, 1993; Alnemri et al., 1996). Daher nannte man diese Proteine später der Einfachheit halber Caspasen (**Cysteinreiche Aspartat-spezifische Proteinasen**) (Thornberry und Lazebnik, 1998).

Die Caspasen wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert und sind im Allgemeinen in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur sehr ähnlich (Cohen, 1997; Salvensen und Dixit, 1997; Villa et al., 1997). Bis heute sind 14 Caspasen beschrieben, von denen 12 auch beim Menschen gefunden wurden.

Die Caspasen liegen in der Zelle als Procaspasen (Zymogene; 30-50 kD) vor, die aus einem einzelnen Polypeptidstrang mit einer N-terminalen Prodomäne, einer großen (~20 kD) und einer C-terminalen kleinen (~10 kD) Untereinheit bestehen (Thornberry und Lazebnik, 1998). Der N-terminale Abschnitt kann Adapterdomänen, wie DEDs (*Death effector domains*) oder CARDs (*Caspase activator recruitment domains*) enthalten oder nur aus einem relativ kurzen Sequenzabschnitt bestehen. Während der Aktivierung wird zwischen der kleinen und großen Untereinheit geschnitten und dann die Prodomäne entfernt (Nicholson und Thornberry, 1997). Die aktive Form der Caspase ist ein Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten mit zwei voneinander unabhängigen katalytischen Zentren (Blanchard et al., 1999) (siehe Abb. 1.2).

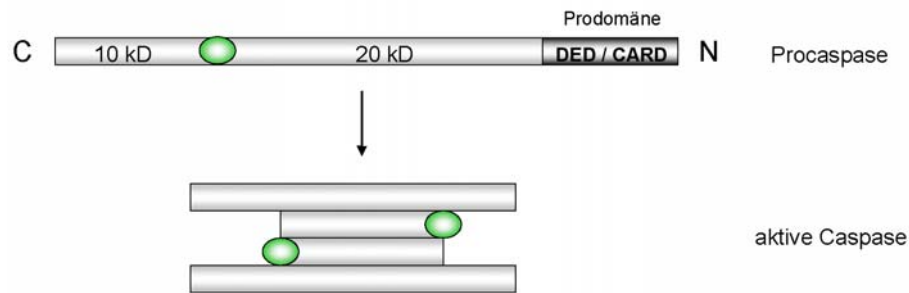


Abb. 1.2: Procaspasen – Caspasen. Caspasen werden in der Zelle als inaktive Vorstufen synthetisiert. Die Spaltung der katalytisch inaktiven Procaspase führt zur Abspaltung der Prodomäne und zum aktiven Heterotetramer, das aus jeweils zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten sowie zwei unabhängigen aktiven Zentren/Linker Regionen (grüne Ellipsen) besteht.

Sieben der bekannten Caspasen (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) spielen eine Rolle bei der Apoptose (Earnshaw et al., 1999). Andere sind an Entzündungsprozessen beteiligt (Caspase-1, -4, -5, -13) oder stehen in Korrelation mit der Enddifferenzierung von Keratinozyten (Caspase-14) (Enari et al, 1998; Eckhart et al., 2000). Je nach Substratspezifität lassen sie sich in Gruppen einteilen. Beim apoptotischen Geschehen unterscheidet man die Initiator- (Caspasen-2, -8, -9, -10) und die Effektorcaspasen (Caspasen-3, -6, -7), die sich durch die Länge und Struktur der Prodomäne unterscheiden (siehe Abb. 1.3).

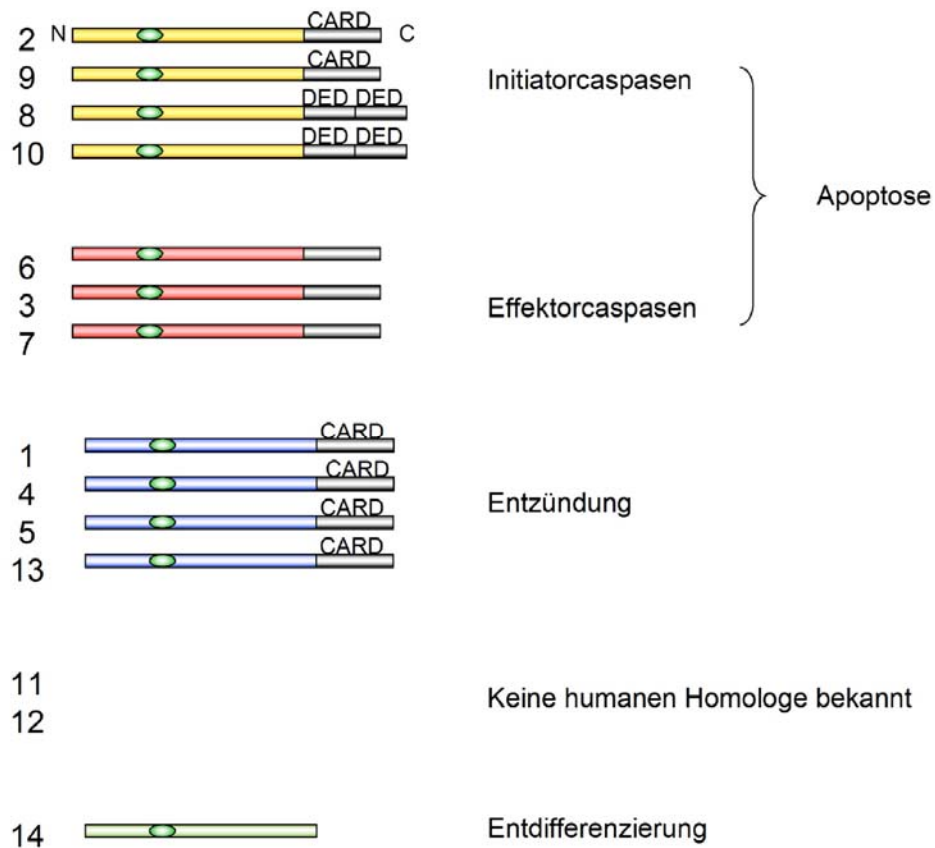


Abb. 1.3: Caspasen-Familie. Die Caspasen lassen sich nach Substratspezifität unterteilen. Man unterscheidet, die an der Apoptose beteiligten Initiator- (gelb) und Effektorcaspasen (rot) sowie an Entzündungsprozessen (blau) und Differenzierung (grün) beteiligte Caspasen. Zu den Caspasen-11 und -12 konnte bisher kein humanes Homolog identifiziert werden.

Initiatorcaspasen, die eine lange Prodomäne besitzen, sind in der Lage sich durch Oligomerisation autokatalytisch zu aktivieren und dann die Effektorcaspasen durch Spaltung zu aktivieren (Chang et al., 2003). Die Caspasen sind Enzyme einer Signalkaskade, der so genannten Caspasen-Kaskade, die schließlich in der Zerlegung von Zellbestandteilen endet.

Caspasen spalten verschiedene Proteine und führen so zu den typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose. Es sind über 280 Proteine bekannt, die von den Caspasen gespalten werden können und als Todessubstrate bezeichnet werden (Fischer et al., 2003; Daniel et al., 2001). Die Aktivierung der Caspasen erfolgt hierarchisch, über zwei bisher bekannte Signalwege, den extrinsischen oder Rezeptor-vermittelten und den intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg. Beide Signalwege arbeiten zusammen und beeinflussen sich gegenseitig (Green und Reed, 1998; Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.3.3 Signalwege der Apoptose

1.3.3.1 extrinsischer Signalweg

Zur Übermittlung extrazellulärer, apoptotischer Signale, stehen der Zelle an der Zelloberfläche eine Reihe von Rezeptoren zur Verfügung. Im Mittelpunkt steht die Familie der TNF-Rezeptoren. Es handelt sich um Membranproteine, die 2 bis 6 charakteristische extrazelluläre Cystein-haltige Domänen besitzen, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden, sobald es zur Bindung eines Liganden gekommen ist und eine Trimerisierung oder Oligomerisierung des Rezeptors stattgefunden hat (Banner et al., 1993).

Einige Rezeptoren besitzen eine homologe Aminosäuresequenz von ca. 80 AS, die als Todesdomäne (DD, *Death domain*) bezeichnet wird und proapoptotische Signale ermöglicht (Tartaglia et al., 1993). Es kommt daher zu einer Unterteilung in Rezeptoren mit DD, den so genannten Todesrezeptoren und Rezeptoren ohne DD. Zu den Todesrezeptoren zählen TNF-R1, CD95, TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor*), TRAIL-R2, TRAMP (*TNF receptor-related apoptosis-mediating protein*) und DR6 (*Death receptor-6*) (Daniel et al., 2001). Aktiviert werden diese Rezeptoren durch Liganden, von denen im Folgenden exemplarisch zwei beschrieben werden.

TNF (*tumor necrosis factor*) ist ein proinflammatorisches zytotoxisches Zytokin, das im Jahre 1975 aufgrund seiner Eigenschaften in transplantierten Tumoren hämorrhagische Nekrosen auszulösen identifiziert wurde (Carswell et al., 1975). Wird es in großen Mengen ausgeschüttet, kann es im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen zum septischen Schock und zum Multiorganversagen führen (Aggarwal, 2003; Mannel und Echtenacher, 2000).

In erster Linie wird TNF von Makrophagen und Monozyten, aber auch Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und vielen anderen Zellen exprimiert, wobei es nicht konstitutiv, sondern nur von aktivierten Zellen gebildet wird. Stimuli der Aktivierung können Lipopolysaccharide (LPS), Interleukine (IL-1, IL-3), Wachstumsfaktoren (GM-CSF), IFN- γ und Tumornekrosefaktoren selbst sein.

Man unterscheidet TNF- α und TNF- β mit ähnlicher Glykopeptidstruktur, die bei Entzündungen, Infektionen, Verletzungen und Gewebeveränderungen sezerniert werden (Baud und Karin, 2001). Es interagiert an der Zelloberfläche mit zwei

Rezeptoren, TNF-R1 und TNF-R2, welche mit Ausnahme von Erythrozyten auf den meisten Zellen des Körpers exprimiert werden (Micheau und Tschopp, 2003).

TNF- α existiert in zwei Formen, einer membrangebundenen (memTNF) und einer löslichen Form (sTNF) (Wajant und Scheurich, 2001). sTNF aktiviert bevorzugt TNF-R1, während memTNF beide Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2) aktivieren kann (siehe Abb. 1.4).

Der TNF-R1 kann durch eine intrazelluläre Todesdomäne Adaptermoleküle rekrutieren und so verschiedene Signalwege aktivieren. Der TNF-R2 besitzt im Gegensatz dazu keine Todesdomäne. Durch ein intrazelluläres Motiv, an welches TRAFs (*TNF-receptor-associated factor*) binden, kann er jedoch über den NF- κ B (*Nukleärer faktor κ B*)-Signalweg eine verstärkte Bildung von endogenem memTNF initiieren und so auf indirektem Weg die Apoptose steigern (Grell et al., 1995-1996; Wajant et al., 2003).

Durch die Liganden-Bindung an TNF-R1 kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und einer Interaktion zwischen der DD des Rezeptors und dem Adaptermolekül TRADD (*TNF-Receptor associated death domain*), das als Plattform für die Bindung weiterer Signalmoleküle dient. Durch die Bindung von TRAF2, RIP (*Receptor interacting protein*) und CLAP (*CARD-like apoptotic protein*) kommt es zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (Legler et al., 2003). Wird dagegen FADD (*Fas-associated death domain*) in den so genannten Tod-induzierenden Signalkomplex (DISC, *death inducing signaling complex*) rekrutiert, kann diese über eine N-terminale Todeseffektordomäne (DED, *Death effector domains*) mit der Procaspase-8 interagieren und diese aktivieren (Micheau und Tschopp, 2003). Der Aktivierung der Caspase-8, folgt entweder die Aktivierung der Caspase-3 oder eine Signalweiterleitung an das Mitochondrium (Ashkenazi und Dixit, 1998; Scaffidi et al., 1999).

Zur Signalweiterleitung an die Mitochondrien spaltet die Caspase-8 das zytoplasmatische Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*). Nach Aktivierung bindet Bid an die in der Mitochondrienmembran lokalisierten antiapoptotischen bcl-2-Proteine, um deren Aktivität zu neutralisieren und so die von ihnen blockierten proapoptotischen Proteine Bax (*Bcl-2 associated x protein*) und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) zu befreien (Daniel et al., 2003). Sie unterliegen einer Konformationsänderung, werden tiefer in die Mitochondrien integriert und führen zur Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran und somit zur Aktivierung des mitochondrialen Signalweges, der auf indirektem Weg zur aktiven Caspase-3 führt

(Green und Kroemer, 2004; Zamzami und Kroemer, 2001). Die Caspase-3 spaltet dann, mit denen von ihr aktivierten Caspasen-6 und -7, zahlreiche Todessubstrate, die zum Untergang der Zelle führen.

Folglich sind der extrinsische und intrinsische Signalweg über die Aktivierung von Bid verbunden und laufen nicht streng getrennt voneinander ab (siehe Abb. 1.4). Es konnte gezeigt werden, dass neben der Caspase-8 auch die homologe Caspase-10 eine initiiierende Rolle bei der rezeptorvermittelten Apoptose spielt und zelltypspezifisch Caspase-8 ersetzt (Boatright und Salvesen, 2003).

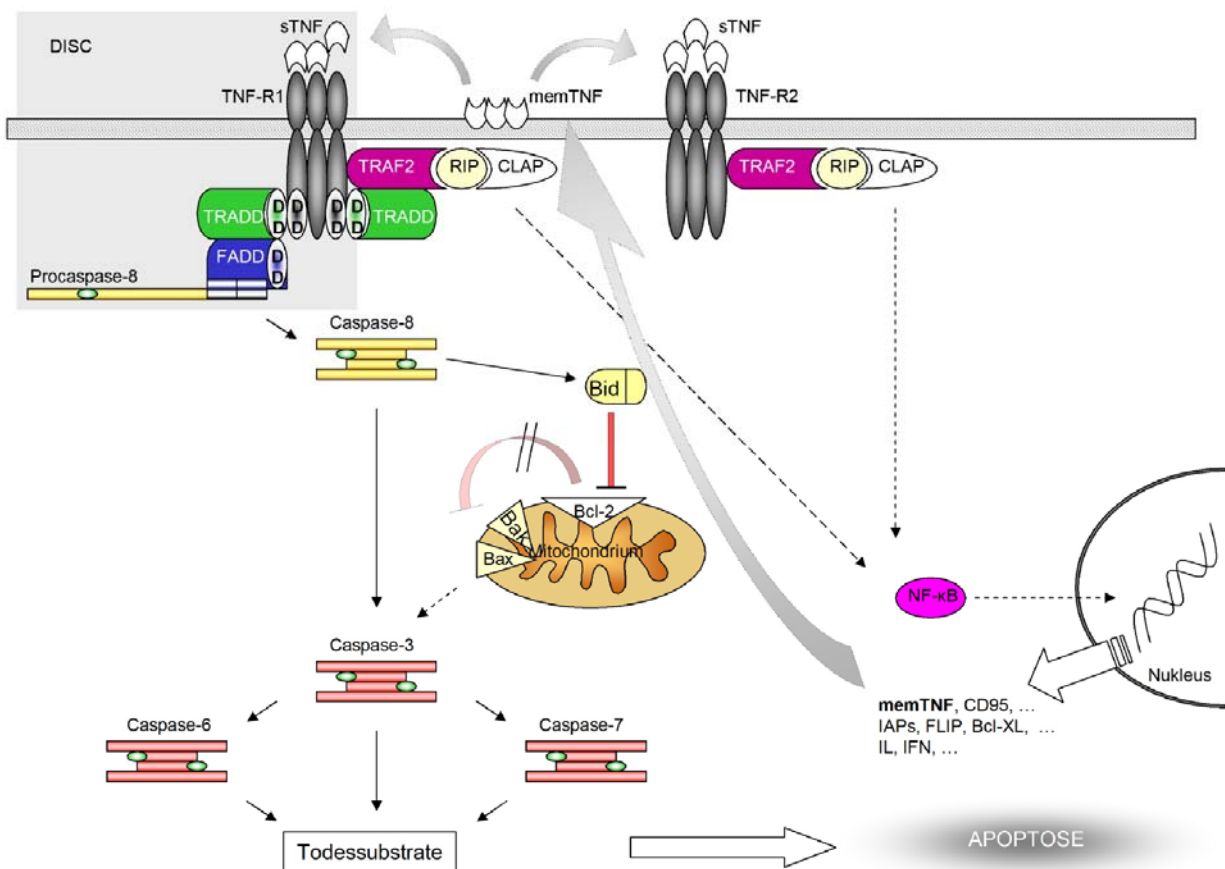


Abb. 1.4: extrinsischer Signalweg. Nach Bindung von TNF- α an TNF-R1 kommt es zur Rekrutierung von Adapterprotein TRADD. Durch die Bindung von FADD im DISC wird die Procaspase-8 aktiviert. Einerseits folgt die Aktivierung der Procaspase-3, andererseits die Aktivierung des intrinsischen Signalweges. Durch Aktivierung von Bid Hemmung von Bcl-2-Proteinen, die die proapoptischen Eigenschaften der Proteine Bax und Bak blockieren. Es folgt die Porenbildung und Freisetzung zahlreicher Proteine, die auf indirektem Weg zur aktiven Caspase-3 führen. Die Caspase-3 spaltet dann, mit den von ihr aktivierten Caspasen-6 und -7, zahlreiche Todessubstrate, die zum Untergang der Zelle führen. Binden TRAF2 und RIP an TNF-R2 oder über das Adapterprotein TRADD an TNF-R1 kommt es nach Bindung von CLAP zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, der zur Steigerung der Bildung von endogenem memTNF führt und die Apoptose so auf indirektem Weg unterstützt.

CD95 war das nächste Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, das 1989 von deutschen und japanischen Wissenschaftler unabhängig voneinander entdeckt wurde. Sie fanden einen Antikörper, der bei Tumorzellen Apoptose auslöste und somit das Tumorwachstum hemmte. Das Antigen gegen diesen Antikörper wurde von den Deutschen APO-1 und von den Japanern Fas (*Fibroblast associated antigen*) genannt (Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989). Die internationale Bezeichnung ist CD95.

Wichtige Funktionen liegen in der Regulation des Immunsystems durch Elimination von aktivierten T-Zellen nach Immunantwort, virusinfizierten und malignen Zellen sowie in der Regulation der Entwicklung und Reifung der Immunzellen (Ashkenazi und Dixit, 1998; Krammer, 2000b).

Durch die Rezeptor-Bindung des CD95-Liganden (CD95L) kommt es wie bei TNF zur Trimerisierung des Rezeptors, Rekrutierung des Adapterproteins FADD und der Procaspase-8 im DISC und zur Aktivierung der Procaspase-8. Es folgt die Aktivierung der Procaspase-3 oder die Signalweiterleitung an das Mitochondrium (siehe Abb. 1.4).

1.3.3.2 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Weg der Apoptose kann durch physiologische und pathophysiologische Stimuli, u.a. genotoxische Substanzen (wie z.B. Zytostatika, NO), ionisierende Strahlung, den Wegfall von wichtigen Überlebensfaktoren (wie z.B. Wachstumsfaktoren) sowie durch Interaktion mit dem Todesrezeptor-regulierten Signalweg initiiert werden. Insbesondere wird der intrinsische Signalweg auch durch den Transkriptionsfaktor p53 eingeleitet, der nach zellulärem Stress, wie DNA-Schäden, Hypoxie oder durch mitogene Onkogene aktiviert wird (Philipp-Staheli et al., 2004).

Durch proapoptotische BH3 (*bcl-2 homology 3*)-only-Proteine der Bcl-2-Familie, die nur eine BH3-Domäne enthalten, wie z.B. Bid, Bad, Noxa und PUMA, werden die Signale an die Mitochondrien übertragen. Diese Proteine binden die antiapoptotischen bcl-2-Proteine, so dass die von ihnen gehemmten proapoptotischen Proteine Bax und Bak durch Porenbildung zu einer Verringerung des Mitochondrienmembranpotentials und somit zum Austritt von Makromolekülen, wie beispielsweise Cytochrom c, AIF (*apoptosis inducing factor*), Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) ins Zytosol führen (Green und Kroemer, 2004). Dort bildet das freigesetzte Cytochrom c mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), dATP und der Procaspase-9 so

genannte Apoptosomen. Diese Komplexe vermitteln durch die räumliche Nähe die Aktivierung der Caspase-9, die eine Rekrutierung und Spaltung der Caspase-3 und -7 nach sich zieht (Hengartner, 2000). Bei der Aktivierung der Caspase-3 treffen der intrinsische und der extrinsische Signalweg aufeinander und münden in eine gemeinsame Endstrecke. Welcher der beiden Hauptwege vorrangig aktiviert wird, hängt vom jeweiligen Zelltyp und Stimulus ab (siehe Abb. 1.5).

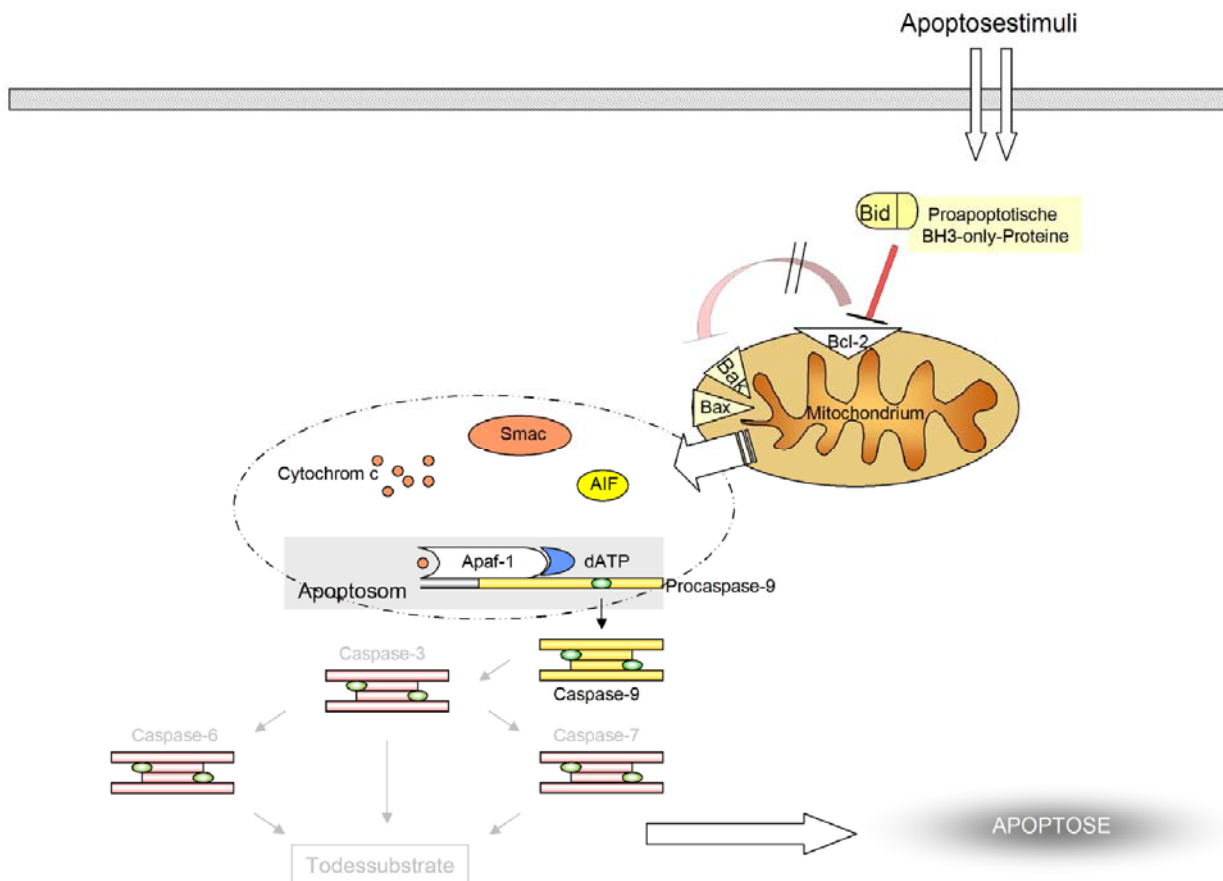


Abb. 1.5: intrinsischer Signalweg. Zahlreiche Apoptosestimuli aktivieren proapoptische BH3-only-Proteine (z.B. Bak, Bax), die wiederum antiapoptische Bcl-Proteine blockieren und somit durch proapoptischen Proteine wie Bak und Bax mittels Porenbildung in der Mitochondrienmembran die Freisetzung zahlreicher Proteine fördern. Cytochrom c, Apaf-1, Procaspase-9 und dATP bilden den Apoptosom-Komplex und führen zur Aktivierung der Caspase-9. Durch die Aktivierung von Caspase-3 und -7 wird der Untergang der Zelle eingeleitet.

1.4 Regulatoren der Apoptose

An der komplexen Regulation der Apoptose sind zahlreiche Proteine beteiligt, die über ihre pro- bzw. antiapoptische Wirkung in die Entscheidung über Leben und Tod der Zelle eingreifen. Hierzu zählen u.a. die Mitglieder der Bcl-2-Familie, p53, NF- κ B, Caspaseninhibitoren wie IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*) und cFLIP (*cellular*

FLICE inhibitory protein), AIF, Smac und weitere Proteine wie z.B. NOS (*Stickstoffmonoxid-Synthase*). Im Folgenden wird auf die regulierenden Faktoren eingegangen, die für das Verständnis der Arbeit stärkere Bedeutung haben.

1.4.1 Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*)-Proteine

Bcl-2 wurde in folliculären B-Zell-Lymphom-Zellen als erstes Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie entdeckt (Tsujimoto et al., 1985). Die weiteren Mitglieder wurden aufgrund von Sequenzhomologie oder ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert (Chao und Korsmeyer, 1998).

Die Mitglieder, von denen mittlerweile mehr als 28 bekannt sind und sich anhand der Anzahl ihrer alpha-helikalen BH (*Bcl-2 homology*)-Domänen unterscheiden, können ihrer Aktivität nach in pro- (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid u.a.) und antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w u.a.) Proteine eingeteilt werden (Adams und Cory, 1998). Sie kontrollieren die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien und nehmen damit eine Schlüsselposition innerhalb des mitochondrialen Apoptoseweges ein. Die allgemein akzeptierte Theorie des Rheostat-Modells besagt, dass das molare Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen darüber bestimmt, ob Apoptose ausgelöst oder verhindert wird (Korsmeyer et al, 1993).

Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und schützen die Membranintegrität. Durch ihre Hemmung der proapoptotischen Proteine wie Bax und Bak, die aktiviert zu einer Konformationsänderung, Porenbildung und Freisetzung der Makromoleküle wie Cytochrom c, Smac, Endonuklease G, AIF und Omi/HtrA2 führt, wird die Apoptose verhindert. Die proapoptotischen BH3-only-Proteine (z.B. Bid, Bad) wiederum sind teils zytosolisch oder nur lose an Membranen gebunden lokalisiert und werden als Trigger der Apoptosekontrolle betrachtet und durch unzählige Stimuli aktiviert. Aktiviert binden sie die antiapoptotischen bcl-2-Proteine, um ihre Aktivität zu neutralisieren und die proapoptotischen Proteine Bax und Bak von ihrer Blockierung zu befreien (Daniel et al., 2003) (siehe Abb. 1.5).

1.4.2 p53

p53, ist ein nukleäres 53 kD-Phospho-Protein, das die zelluläre Antwort auf endogene und exogene DNA-Schädigung reguliert und daher in der Literatur auch als „Hüter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane, 1992). p53 wird durch zytotoxischen Stress, DNA-Schäden oder in Gegenwart von aktivierten Onkogenen aktiviert, wirkt über die Expression verschiedener Proteine bidirektional und arretiert entweder den Zellzyklus, um die geschädigte DNA zu reparieren, oder führt die Elimination der Zelle durch Apoptose herbei (Philipp-Staheli et al., 2004; Sidransky und Hollstein, 1996; Vogelstein et al., 2000). Bei irreparablen Schäden kommt es zur Inhibierung der Transkription des antiapoptotischen Bcl-2 und zur Expression proapoptotischer Bcl-2-Proteine, die die Dysregulation der mitochondrialen Integrität induzieren (Wu und Deng, 2002).

Mutierte p53-Gene finden sich in etwa der Hälfte aller menschlichen Tumoren. Bei vielen Hauttumoren lassen sich inaktivierende Punktmutationen des p53-Gens nachweisen, die den betroffenen Zellen erlauben, weitere DNA-Schäden zu akkumulieren und der Apoptoseinduktion zu entgehen (Paus et al., 1995). Im Gegensatz zu den meisten epithelialen Tumoren zeigten sich inaktivierende p53-Mutationen beim Melanom mit < 5% und bei Melanom-Metastasen < 25% eher selten (Satyamoorthy et al., 2000).

1.4.3 AIF

AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) ist ein 57 kDa großes Flavoprotein, das erstmals im Überstand permeabilisierter Mitochondrien entdeckt wurde. In gesunden Zellen wird es nach seiner Synthese im Zytosol im Intermembranraum der Mitochondrien gespeichert. Nach der Apoptoseinduktion wird AIF in den Zellkern transloziert, um dort an der Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation teilzunehmen (Susin et al., 1999).

AIF kann je nach apoptotischem Stimulus sowohl Caspasen-abhängig als auch Caspasen-unabhängig aktiviert werden (Cande et al., 2004). Die induzierten Effekte sind Caspasen-unabhängig. Wobei es auf verschiedenen Ebenen Wechselwirkungen zwischen AIF und der Caspasen-Kaskade gibt.

Es gibt viele Faktoren, die in die AIF-Freisetzung verwickelt sind, so z.B. PARP-1 (*nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1*). PARP-1 ist ein Enzym, das die DNA-Reparatur, -Transkription und -Replikation reguliert (Hong et al., 2004). Bei

Überexpression, z.B. durch exzessive DNA-Zerstörung, führt es zum Zelltod. Eine interessante Hypothese ist die Abhängigkeit der PARP-1-vermittelten Apoptose von der AIF-Translokation in den Zellkern (Yu et al., 2002). Wird PARP-1 inhibiert, wird auch die AIF-Ausschüttung aus dem Mitochondrium verhindert (Du et al., 2003). Ob die Interaktion zwischen diesen beiden Molekülen direkt oder indirekt ist, ist nicht klar, die Lokalisation in den Mitochondrien ist umstritten (Ye et al., 2002).

Die durch AIF vermittelte Apoptose kann durch die Überexpression von Bcl-2 gehemmt werden, wobei lediglich die Freisetzung von AIF erschwert wird. Bcl-2 hat keinen Einfluss auf die Bildung oder Aktivität (Susin et al., 1999). Außerhalb des Mitochondriums scheint der zytoprotektive Faktor der Familie der Hitzeschock-Proteine Hsp70 die proapoptotischen Eigenschaften von AIF zu inhibieren, wobei der Mechanismus diskutiert wird, aber bisher nicht bekannt ist (Gurbuxani et al., 2003). Weiterhin kann AIF durch Survivin antagonisiert werden (Liu et al., 2004) (siehe Abb. 1.6).

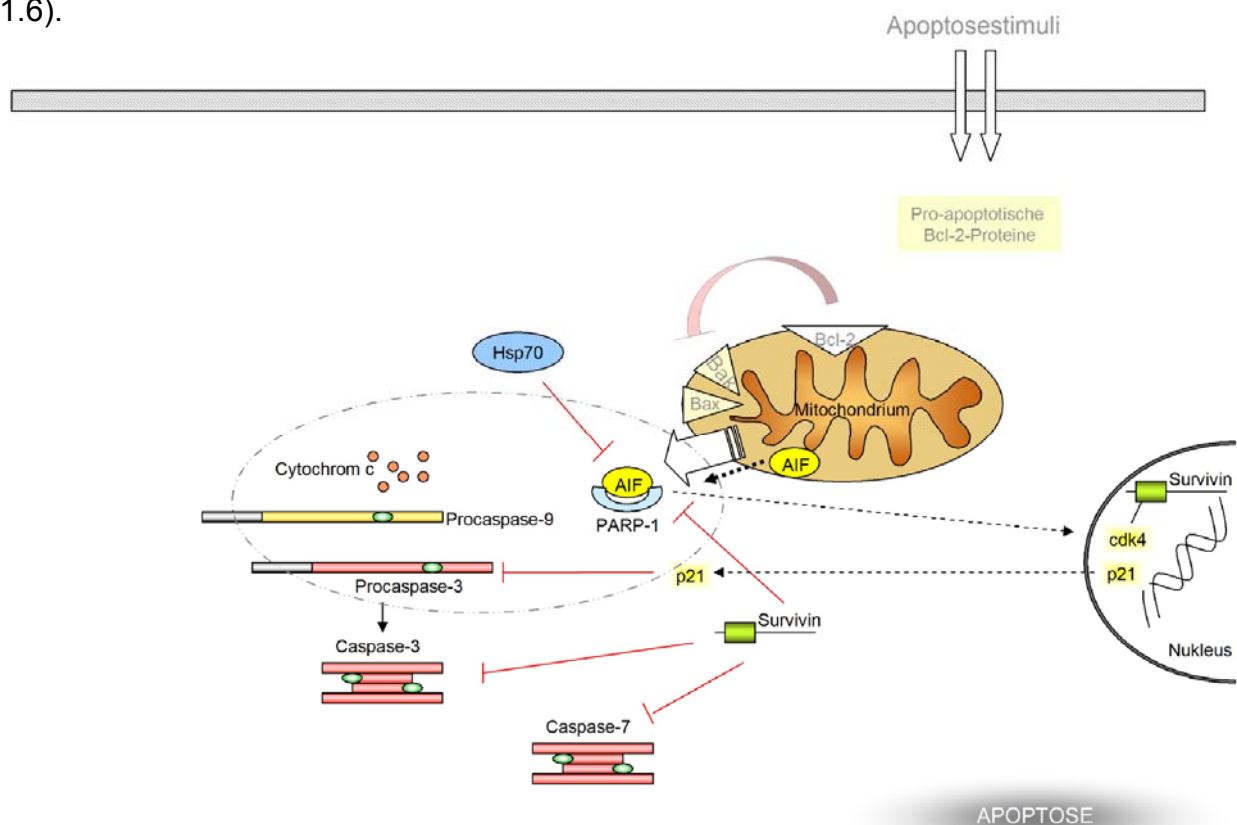


Abb. 1.6: Regulation der Apoptose durch AIF. Das im Intermembranraum lokalisierte AIF transloziert nach apoptotischer Stimulation durch die Aktivierung von PARP-1 (nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1) in den Nukleus. Dort induziert es sowohl eine Chromatinkondensation als auch DNA-Fragmentierung. Die Freisetzung von AIF kann durch die Überexpression von Bcl-2, die apoptotischen Eigenschaften durch Survivin und Hsp70 gehemmt werden. Survivin ist im Zytosol als auch im Nukleus lokalisiert. Neben der antagonisierenden Wirkung von AIF bindet es die aktiven Caspasen-3 und -7. Der Bindungspartner cdk4 setzt bei kompetitiver Interaktion p21 frei, das die mitochondriale Procaspase-3 bindet und inhibiert.

1.4.4 NF-κB

Als NF-κB (*nukleärer Faktor κB*) wird allgemein eine Reihe von Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die ähnliche DNA-Sequenzen erkennen und binden können. Bisher sind in Säugetieren fünf NF-κB-Proteine bekannt: cRel, RelA, RelB, NFκB1/p50 und NFκB2/p52 bekannt. Während die Rel-Proteine Transkriptionsaktivierungs-Domänen besitzen, fehlen diese in p50 und p52. Ihre Aktivierungsfunktion besteht darin, mit einem der drei Rel-Proteine Heterodimere zu bilden (May und Ghosh, 1997).

NF-κB liegt im Zytosol inaktiv an seinen Inhibitor I-κB gebunden vor (Zandi und Karin, 1999). Die Aktivierung durch TNF-α, Interleukin-1 oder Lipopolysaccharide resultiert in der Aktivierung des IκB-Kinasen-Komplexes (IKK), die den Abbau des Inhibitors I-κB vermittelt und so NF-κB frei gibt. Dieses transloziert in den Zellkern und bewirkt dort die Transkription seiner Zielgene (Stancovski und Baltimore, 1997). Hierzu zählt auch I-κB, das die Bindung von NF-κB an die DNA löst und erneut einen Komplex mit NF-κB bildet (Zabel und Baeuerle, 1990). Der inaktive NF-κB/IκB-Komplex wird dann zurück in das Zytoplasma transportiert (Arenzana-Seisdedos et al., 1997) (siehe Abb. 1.7).

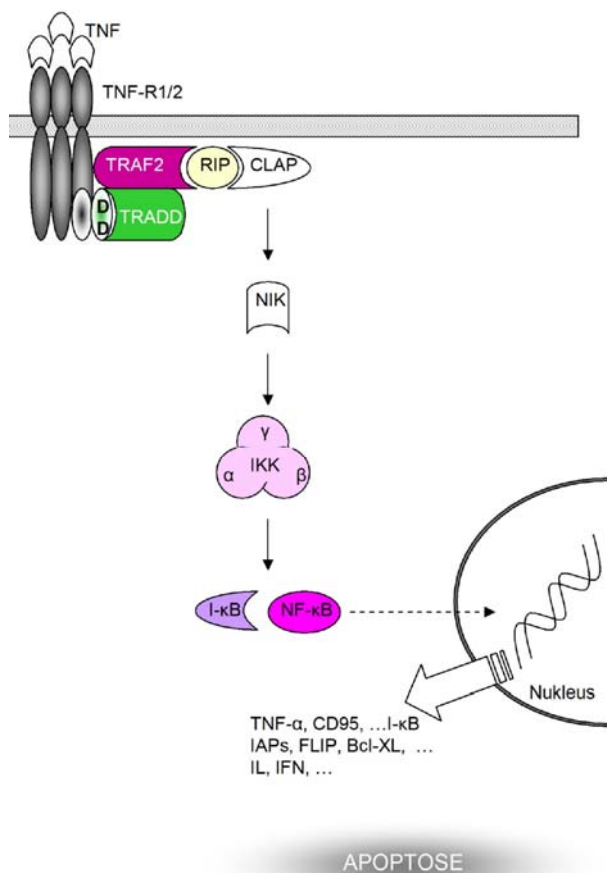


Abb. 1.7: Regulation der Apoptose durch NF-κB. NF-κB liegt im Zytosol in inaktiver Form an seinen Inhibitor I-κB gebunden vor. Die Aktivierung erfolgt neben IL-1 und LPS durch TNF-α über den TNF-R1. Nach der Rekrutierung von TRADD kommt es zur Bindung von TRAF2. Durch RIP wird der Komplex stabilisiert. Nach Bindung vom CLAP (CARD-like apoptotic protein) wird die NIK (NF-κB-inducing kinase) induziert, die wiederum den IKK (I-κB-kinase)-Komplex, der im Wesentlichen aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKKα und β und der regulatorischen Untereinheit IKKγ besteht, phosphoryliert. Die aktivierten Kinasen IKKα und IKKβ sorgen für den Abbau des Inhibitors I-κB. NF-κB wird frei, transloziert in den Zellkern und bewirkt dort die Transkription seiner Zielgene, die sowohl pro- als auch antiapoptotisch sein können.

In Abhängigkeit vom Stimulus und vom zellulären Kontext kann NF- κ B sowohl proapoptotische Gene wie TNF- α und CD95, als auch antiapoptotische Gene wie IAPs, Bcl-X_L und FLIP aktivieren. Weiterhin kommt es zur Produktion und Ausschüttung von Zytokinen der Immunantwort, wie z.B. Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) und Interferon- γ (Bours et al., 2000).

In humanen Tumoren sind die Gene, die für NF- κ B oder den Inhibitor von NF- κ B (I- κ B) kodieren, häufig amplifiziert oder transloziert, so dass die antiapoptotische Wirkung überwiegt (Rayet und Gelinas, 1999; Barkett und Gilmore, 1999). NF- κ B hat daher eine große Bedeutung in der Onkogenese und der Chemotherapieresistenz verschiedener Neoplasien.

Für die Caspase-8 konnte weiterhin gezeigt werden, dass sie neben der Rolle als Initiatorcaspase, als Signaltransduktormolekül zur Aktivierung von NF- κ B und JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*) fungieren kann (Hu et al., 2000; Chaudhary et al., 1999).

1.4.5 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) entspricht dem 1980 entdecktem endothelium-derived relaxing factor (EDRF) und dient unter anderem als Neurotransmitter, Vasodilatator und hemmt die Thrombozytenaggregation und Adhäsion (Furchgott und Zawadzki, 1980; Parratt, 1998).

Es ist ein neutrales gasförmiges Radikal, das mittels einer NO-Synthase bei der Reaktion von der Aminosäure Arginin zu Citrullin entsteht. Es kann durch biologische Membranen diffundieren und hat in biologischen Flüssigkeiten nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, da es rasch von molekularem Sauerstoff zu den stabilen Endprodukten Nitrit und Nitrat oxidiert wird (Lancaster, 1994). An der äußeren Zellmembran reagiert es jedoch mit Superoxid-Anionen zu Peroxynitrit, das zu einer Lipid-Peroxidation und dadurch zur Apoptoseinduktion führen kann (Koppenol et al., 1992; Hogg und Kalyanaraman, 1999; Heigold et al., 2002). Bisher wurden drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) in humanen Zellen identifiziert und zunächst anhand der Gewebe, aus denen sie isoliert wurden, benannt: neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS), die unter anderem in Makrophagen, Neutrophilen, Hepatozyten und Myozyten zu finden sind. nNOS und eNOS sind stets im Zytosol verfügbar und Calcium- und Calmodulin-abhängig

aktivierbar. iNOS hingegen ist Calcium-unabhängig und wird erst durch einen exogenen Reiz, wie durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine wie Interferon- γ , Interleukin-1, -2 und -6 oder TNF- α , in der Zelle synthetisiert (Taylor et al. 1998). Andere Zytokine wie z.B. transforming growth factor- β , IL-4 und -10 führen hingegen zu einer Hemmung der iNOS-Bildung. Auch Glukokortikoide hemmen die Expression der iNOS (Kunz et al., 1996).

Geringe physiologische Mengen an NO, die von den konstitutiven NO-Synthasen produziert werden, wirken im kardiovaskulären System vasodilatierend und antithrombotisch (Loscalzo und Welch, 1995). Weiterhin kann es der entzündlichen Gewebeschädigung durch Supprimierung der T-Zell-Proliferation und -Aktivität, Hemmung der Synthese von IL-6, Prostaglandin E2 und Thromboxan sowie der Freisetzung von plättchenaktivierenden Faktoren und Histamin aus Mastzellen entgegenwirken (Hoffman et al., 1993; Salvemini et al., 1995; Cooke und Tsao, 1993). Die exprimierte iNOS produziert jedoch, einmal aktiviert, über einen längeren Zeitraum große Mengen an NO, welche die physiologische NO-Freisetzung durch die konstitutiven Enzyme um etwa das 100-1000 fache übersteigen kann. Die iNOS ist in zahlreichen akuten und chronischen Entzündungsreaktionen exprimiert und kann konzentrationsabhängig toxisch auf Bakterien, Pilze, Protozoen, Helminthen sowie Tumorzellen wirken (Kröncke et al., 1998; Zamora et al., 2000).

Zwischen der gesteigerten iNOS-Expression und der Apoptose konnte in vielen Zellen, unter anderem in murinen Melanomzellen und Mamma-Karzinomzellen, murinen Makrophagen und β -Zellen des Rattenpankreas, eine positive Relation beschrieben werden (Xie et al., 1997; Binder et al., 1999; Dimmeler und Zeiher, 1997). In humanen Melanomzelllinien konnte, im Vergleich zu humanen Melanozyten, iNOS nur in geringen Mengen gefunden werden. Auch die Behandlung mit IFN- γ , TNF- α oder LPS zog nur in Melanozyten eine Induktion der iNOS nach sich, so dass iNOS bei der Apoptose von Melanomzellen keine wichtige Rolle einzunehmen scheint (Fecker et al., 2002). Es wird jedoch eine entscheidende Stellung bei der Melanozytentransformation und Tumorprogression kontrovers diskutiert.

1.4.6 Apoptose inhibierende Proteine - IAPs

Die Apoptose inhibierenden Proteine (IAPs) sind phylogenetisch konservierte antiapoptotische Proteine, die durch die Regulation der Caspasen-Aktivität und der proapoptotischen Faktoren Einfluss auf die Apoptose nehmen (Salvesen und Duckett, 2002).

1993 wurde von Crook et al. in Insektenzellen das erste IAP entdeckt, das sich beim genetischen Screening nach Überlebensregulatoren in baculoviral infizierten Insektenzellen fand (Crook et al., 1993). Anschließend konnten in Fliegen, Würmern, Mäusen und Menschen homologe Proteine identifiziert werden (Deveraux und Reed, 1999). Beim Menschen fanden sich bisher acht dieser Proteine, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert wurden (BIRC (*Baculoviral IAP-repeat-containing Protein*) 1-7) und in dieser Arbeit unter folgenden Namen behandelt werden: NAIP (*Neuronal apoptosis inhibitory protein*), cIAP1, cIAP2, XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), Survivin, Livin, ILP-2 (*IAP-like protein-2*) und Apollon (siehe Abb. 1.1).

Essentiell für die antiapoptotischen Eigenschaften der IAPs sind die so genannten BIR (*baculoviral IAP repeat*)-Domänen, bei denen es sich um Cystein-reiche, Zink-bindende Domänen aus ca. 70 Aminosäuren handelt, von denen die IAPs bis zu drei Stück besitzen (Crook et al., 1993; Hids et al., 1999). Einige IAPs besitzen noch eine C-terminal lokalisierte RING (*Really Interesting New Gene*)-Domäne, die den proteolytischen Abbau an Proteosomen über E3-Ubiquitin-Ligase vermittelt und somit den antiapoptotischen Effekt verstärkt (Vaux und Silke, 2005). Welche Proteine so ubiquitiniert werden, ist noch nicht abschließend geklärt. Gleichzeitig können IAPs durch die RING Domäne Homodimere und Heterodimere bilden, so dass unter Umständen eine Auto-Ubiquitinierung stattfinden kann (Silke et al., 2002).

Apollon besitzt vergleichbar dazu eine UBC (Ubiquitin-conjugating enzyme)-Domäne, die dem Molekül Ubiquitin-Konjugations-aktivität verleiht. Nur bei cIAP1 und cIAP2 findet sich jeweils zusätzlich eine Protein-interagierende CARD (*Caspase recruitment domain*)-Domäne (LaCasse et al., 1998) (siehe Abb. 1.8).

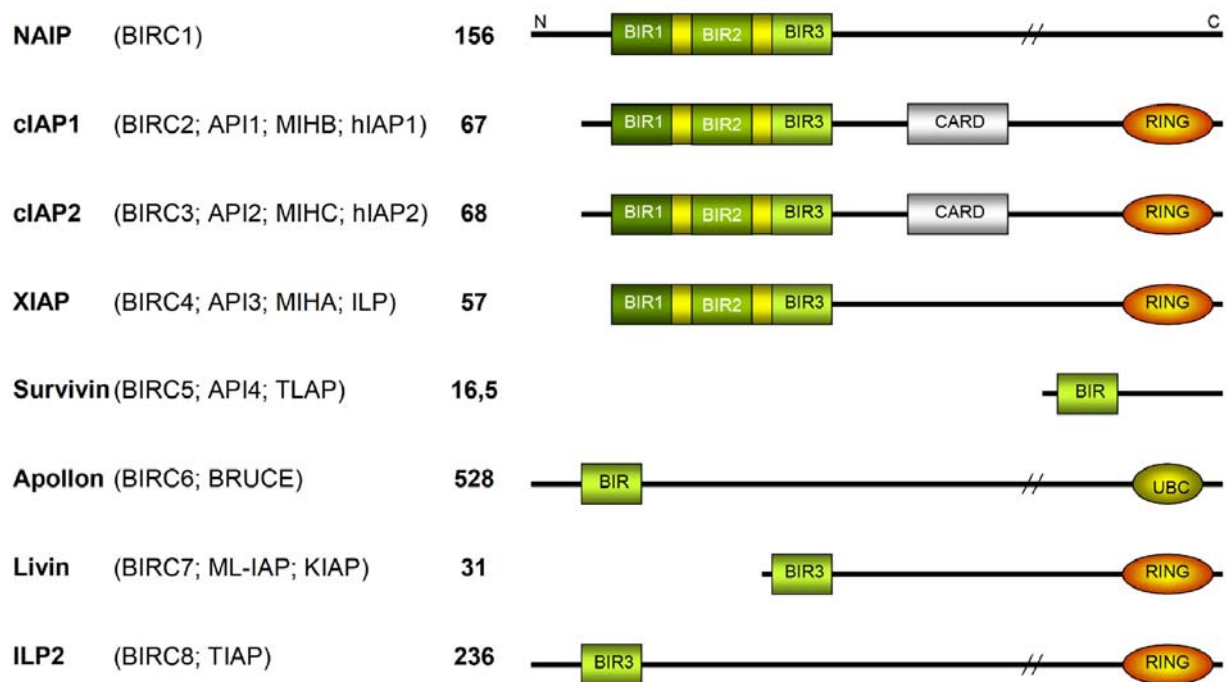


Abb. 1.8: IAP-Struktur. Charakteristisch für diese Proteine sind 1- 3 BIR-Domänen am Amino-terminalen Ende. In einigen IAPs findet sich noch eine C-terminal lokalisierte RING-Domäne. Apollon besitzt vergleichbar dazu eine UBC-Domäne. Nur bei clAP1 und clAP2 findet sich zusätzlich eine Proteininteragierende CARD-Domäne. Die beistehende dick gedruckte Zahl gibt die Proteingröße in kD an.

IAPs sind in der Lage zwei wichtige Apoptosewege zu blockieren: den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg. Sie können durch die BIR-Domäne direkt am aktiven Zentrum der Caspasen binden und so bereits aktivierte Caspasen inhibieren, je nach IAP sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen. Einige IAPs (clAP1, IAP2) können, durch die Fähigkeit an TRAF1 und 2 zu binden, die Apoptose bereits auf Rezeptorebene blockieren (Uren et al., 1996). Neben der Caspasen-inhibierenden Wirkung haben die IAPs noch andere zelluläre Funktionen. Einige IAPs sind Mediatoren und Regulatoren antiapoptotischer Proteine wie z.B. NF- κ B und v-Rel. So kann NF- κ B die Expression von clAP1, clAP2 und XIAP induzieren, als auch durch sie aktiviert werden (LaCasse et al., 1998; Hofer-Warbinek et al., 2000). Weiterhin beeinflusst Survivin den Zellzyklus positiv (Li et al., 1998). Einige IAPs (Survivin, XIAP) werden in Tumoren überexprimiert und deshalb als potentielle Onkogene angesehen (LaCasse et al., 1998; Vaux und Silke, 2003; Ai et al., 2006). Die Expression von Survivin korreliert in vielen Tumoren mit einer schlechteren Prognose, so dass man versucht Survivin als Biomarker bei der Diagnose, Tumorprogression und zur Überprüfung des Therapieerfolges einzusetzen (Ai et al., 2006; Shariat et al., 2007).

Reguliert werden die IAPs auf der Ebene der Transkription sowie durch die Interaktion mit inhibitorischen Proteinen wie Smac, Omi/HtrA2, XAF1 (*XIAP associated factor 1*) und NRAGE (*Neutrophin receptor-interacting melanoma antigen gene (MAGE) homologue*) (Verhagen et al., 2000; Yang et al., 2003; Liston et al., 2001). Auch Caspasen (Caspase-3 und -7) können einige IAPs (XIAP, cIAP1 und Livin) spezifisch spalten und so inaktivieren (Clem et al., 2001; Deveraux et al., 1999).

Das erste Gen der humanen IAPs, das 1995 identifiziert wurde, war **NAIP** (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) (156 kD). Es wurde im Rahmen der Suche nach dem verantwortlichen Gendefekt der spinalen Muskelatrophie (SMA) gefunden. NAIP wird nur in wenigen Geweben wie Gehirn, Leber, Plazenta und Makrophagen exprimiert (Roy et al., 1995). Da weder eine Expression in Melanozyten noch in Melanomzellen nachgewiesen werden konnte, findet es in dieser Arbeit keine weitere Berücksichtigung.

XIAP (57kD) wurde 1996 identifiziert und ist heute neben Survivin funktionell am besten charakterisiert (Liston et al., 1996). Im gleichen Jahr wurde dieses Protein von zwei weiteren Arbeitsgruppen als hILP und MIHA beschrieben (Duckett et al., 1996; Uren et al., 1996). In der späteren Literatur setzte sich dann jedoch der Name XIAP durch.

Das Protein besitzt 3 BIR-Domänen und eine RING-Finger-Domäne (siehe Abb. 1.8). XIAP kann durch Caspasen gespalten und aktiviert werden sowie andererseits die Caspasen-Aktivität inhibieren (Deveraux et al., 1999). Die Spaltung erfolgt in ein C-terminales Fragment, welches die BIR1- und BIR2-Domäne beinhaltet und ein N-terminales Fragment mit BIR3- und RING-Domäne (Roy et al., 1997). Während das N-terminale Spaltprodukt mit BIR2 präferentiell Caspase-3 und -7 inhibiert, lässt sich für das C-terminale Fragment mit BIR3 eine Präferenz für Caspase-9 beobachten (Deveraux et al., 1999; Johnson et al., 2000). Die BIR1-Domäne spielt bei der Hemmung der Caspasen keine Rolle. Stattdessen ist sie in der Lage den zentralen Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren (Lewis et al., 2004). Die BIR1-Domäne bildet mit der TAK1-Kinase (*TGF β (Transforming growth factor β)-activated protein kinase 1*) und ihrem Kofaktor TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) einen Komplex, welcher über die c-Jun-NH2-terminale Kinase-1 (JNK) NF- κ B aktivieren (Lu et al., 2007). Die RING-Finger-Domäne hat E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Es gibt Hinweise darauf, dass XIAP Caspasen und nach Bindung von Smac auch sich selbst ubiquitinieren kann (Suzuki et al., 2001; Yang et al., 2000). Allerdings gibt es Studien, die diesen Hinweisen widersprechen (Vaux und Silke, 2005).

XIAP wird in allen menschlichen Geweben, außer in Leukozyten des peripheren Blutes, exprimiert und scheint bei einer malignen Entartung von Zellen mit einem Anstieg der Expression zu korrelieren und dient somit als Tumormarker (Liston et al., 1996; Vaux und Silke, 2003). Die XIAP-Überexpression ist wie bei vielen anderen Tumoren auch in malignen Melanomen mit der Resistenz gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie assoziiert (Kluger et al., 2007; Bowen et al., 2003). Eine Regulation der XIAP-Expression könnte ein möglicher Ansatz für die Sensitivierung der Zellen gegenüber verschiedenen Therapien darstellen (Chawla-Sarkar et al., 2004).

clAP1 und **clAP2** wurden erstmals in einem Komplex mit dem TNF-Rezeptor 2 entdeckt. Sie enthalten neben drei BIR-Domänen und einer RING-Domäne, als einzige Mitglieder der IAP-Familie, eine CARD-Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen mit anderen CARD-besitzenden Proteinen vermittelt (Park et al., 2007). Die CARD-Domäne dient u.a. der Interaktion mit den TNF-assoziierten Proteinen TRAF1 und TRAF2 (Uren et al., 1996; Rothe et al., 1995). Die Bindung von clAP1 und clAP2 an die TRAF-Moleküle führt zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, die die Expression antiapoptotischer Proteine wie IAPs, Bcl-X_L und FLIP vermittelt (Wang et al., 1998).

clAP1 und clAP2 werden ubiquitär in fetalen und adulten Geweben exprimiert, wobei die Expression von clAP1 in der adulten Skelettmuskulatur und im Pankreas am höchsten ist. clAP2 findet man v. a. in fetalen Lungen, Nieren sowie adulten Lymphgeweben (Liston et al., 1996).

Survivin wurde 1997 entdeckt und besitzt eine BIR-Domäne. Es ist sowohl im Nukleus als auch im Zytosol lokalisiert, wobei ca. 80% das zytoplasmatische Survivin ausmacht. Die Lokalisation und Expression wird Zellzyklus-abhängig reguliert (Ambrosini et al., 1997). Survivin ist mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindeln assoziiert und insbesondere während der G2/M-Phase detektierbar. Es kann in der G2/M-Phase bis zu 40-fach stärker als in der G1-Phase exprimiert sein (Li et al. 1998).

Survivin bindet die aktiven Caspasen-3, -7 und -9 und verhindert zudem eine Umwandlung der entsprechenden Procaspasen in ihre aktiven Formen (Tamm et al., 1998). Neben der antiapoptotischen Aktivität spielt es eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung. So scheint Survivin mit der Zellzyklus-regulierenden Kinase Cdk4 als Bindungspartner zu interagieren. Durch kompetitive Interaktion wird p21 aus dem Cdk4-p21-Komplex frei und inhibiert durch Bindung die mitochondriale Procaspase-3 (Suzuki et al., 2000) (siehe Abb. 1.6). Eine weitere antiapoptotische Funktion von Survivin ist

der AIF-Antagonismus, der den Caspasen-unabhängigen Signalweg unterbindet und sekundär den Caspasen-abhängigen Signalweg beeinflusst (Liu et al., 2004).

Die Zerstörung der Mikrotubuli hat den Verlust der antiapoptotischen Funktion von Survivin und die verstärkte Aktivität der Caspase-3 zur Folge (Li et al., 1998).

Survivin wird in fetalen und einigen stark proliferierenden Geweben und humanen Tumoren, nicht aber in adulten differenzierten Geweben exprimiert (Ambrosini et al., 1997). Es konnte in nahezu allen bislang untersuchten menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Gianani et al., 2001). Die Expressionsstärke korreliert dabei mit dem Tumorstadium, der Tumoraggressivität und dem sinkenden Patientenüberleben, was es zu einem attraktiven diagnostischen und therapeutischen Parameter macht (Altieri, 2001). Unter anderem induzieren angiogenetische Faktoren die Survivin-Expression, was seine hohen Expressionslevel in Tumoren erklären könnte (Papapetropoulos et al., 2000).

Apollon ist ein weiteres IAP, das aber in Melanozyten und Melanomzellen nicht identifiziert wurde und daher hier nicht weiter behandelt wird (Chen et al., 1999). Es wurde lediglich in einigen Gliomen und Ovarial-Karzinomen nachgewiesen.

Livin und **ILP2** weisen wie Survivin eine BIR- und eine RING-Domäne auf. Da ILP2 weder in Melanomzellen noch in Melanozyten nachgewiesen werden konnte und bisher nur im Hodengewebe sowie in einer lymphoblastischen Zelllinie gefunden wurde, wird es in der Arbeit nicht weiter erwähnt (Richter et al., 2001).

Livin wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben und in der Literatur auch unter den Namen ML-IAP (*melanoma IAP*) und KIAP bekannt (Kasof und Gomes, 2001; Vucic et al., 2000; Lin et al., 2000). Livin existiert in zwei Isoformen (Livin α und Livin β), die unterschiedliche Expressionen und differierende antiapoptotische Eigenschaften zu haben scheinen (Ashhab et al., 2001). Ähnlich wie Survivin ist Livin im Nukleus und an filamentösen Strukturen des Zytoplasmas lokalisiert (Vucic et al., 2000). Der genaue Mechanismus, durch den Livin die Apoptose reguliert, ist unklar, obwohl von einer schwachen Inhibierung der Caspasen-3, -7 und -9 berichtet wird. Es wird angenommen, dass die Apoptosehemmung durch Livin primär über andere Mechanismen als eine direkte Caspasen-Inhibierung erfolgt. Livin bindet an Smac, so dass Smac nicht mehr für die Bindung anderer IAPs bereit steht und somit insgesamt die Caspasen-Inhibierung verstärkt wird (Vucic et al., 2005).

Ursprünglich wurde Livin als Melanom-assoziiert beschrieben, später wurde es jedoch auch in vielen anderen Tumorarten (u.a. Blasen-, Lungen-, Pankreas-, Nierenkrebs) gefunden. Livin wurde in Tumoren aber auch in manchen embryonalen und einzelnen ausgewachsenen Geweben nachgewiesen (Vucic et al., 2000; Lin et al., 2000; Kasof und Gomes, 2001). Für Melanozyten lassen sich in der Literatur kontroverse Untersuchungsergebnisse finden. Einerseits wird von einer fehlenden Livin-Expression berichtet, andererseits finden sich Untersuchungsergebnisse, in denen Livin in Melanozyten exprimiert wird (Vucic et al., 2000; Bowen et al., 2003).

1.4.7 FLIP

cFLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*) wurde aufgrund seiner Strukturhomologie mit der Procaspase-8 kurz nach deren Identifizierung gefunden (Tschopp et al., 1998). Da in der gesamten Arbeit nur mit zellulärem FLIP gearbeitet wurde, beschränkt sich die Bezeichnung im Weiteren auf FLIP. Es besitzt zwei DEDs und ein aktives Zentrum, wobei das Cystein im aktiven Zentrum dieses Proteins gegen Tyrosin ausgetauscht wurde und keine proteolytische Aktivität besitzt. (Irmiler et al., 1997). Es wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, von denen FLIP_L, FLIP_S und FLIP_R auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten (Scaffidi et al., 1999; Golks et al., 2005).

FLIP hemmt als kompetitiver Inhibitor, die Bindung von Procaspase-8 und -10 an den DISC und verhindert somit deren Aktivierung (Scaffidi et al., 1999; Yang et al., 2007). FLIP_L ist jedoch nicht nur ein Inhibitor der Apoptose, sondern kann bei niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen durch Heterodimerisierung auch als Aktivator der Procaspasen-8 und -10 auftreten (Boatright et al., 2003; Micheau et al., 2002). Bei großen Mengen von FLIP_L hingegen, wird die Prozessierung der Caspase-8 am DISC komplett verhindert (Krueger et al., 2001). Weiterhin verstärkt FLIP durch die erhöhte Rekrutierung von RIP, TRAF1 und TRAF2 an den CD95-Rezeptor und damit einhergehender Aktivierung von NF- κ B das proliferative Signal von CD95 (Kataoka et al., 2000). Des Weiteren spielt FLIP eine wesentliche Rolle bei der Induktion von NF- κ B, indem es mit dem IKK (*I- κ B-Kinase*)-Komplex an dessen γ -Untereinheit interagiert. Der Induktor ist hierbei ein Spaltprodukt von FLIP, das bei der Prozessierung der Caspase-8 auftritt (Golks et al., 2006).

FLIP wird in vielen Geweben exprimiert. Die höchsten Expressionslevel von FLIP fanden sich jedoch in Herz, Nieren und lymphatischen Geweben. Für die FLIP-Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien fanden sich in bisherigen Studien sehr inhomogene Ergebnisse, so wurde sowohl eine ubiquitäre Expression, als auch ein ubiquitäres Fehlen von FLIP in Melanozyten und Melanomzellen berichtet (Irmeler et al., 1997; Bowen et al., 2003).

1.4.8 Smac

Smac (*Second mitochondria derived activator of caspases*) ist ein proapoptotisches mitochondriales Protein, das im Jahre 2000 erstmalig als humanes Homolog zu den Apoptose modulierenden Proteinen Reaper, Hid, Grim und Sickie in der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben wurde (Du et al., 2000). Zeitgleich wurde es von Verhagen et al. beschrieben und DIABLO genannt (Verhagen et al., 2000). Mittlerweile konnten unterschiedliche Spleißvarianten von Smac (α , β , γ , δ) identifiziert werden (Roberts et al., 2001).

Nach der Freisetzung aus den Mitochondrien liegt Smac als dimeres Protein mit zwei N-terminalen Enden vor, mit denen es Proteine, die eine BIR-Domäne besitzen, binden und inaktivieren kann (Vaux und Silke, 2003). Smac kann durch Bindung der IAPs deren Caspasen-inhibierende Wirkung antagonisieren und so zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade auf Ebene der Caspasen-9 und -3 führen (Deveraux und Reed, 1999; Duckett, 2005). Smac und die Caspasen konkurrieren dabei um dieselben Bindungsstellen der IAPs, die BIR-Domänen. Röntgenstrukturanalysen ergaben, dass Smac dabei sowohl mit BIR2 als auch mit BIR3 von XIAP interagiert, wobei die Affinität zu BIR3 ca. 10-fach stärker ist (Srinivasula et al., 2001). Für die antagonistischen Proteine, Smac und die IAP-Familienmitglieder, zeichnet sich so eine wechselseitige Regulation auf, die mit dem Zusammenspiel zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie vergleichbar ist. Aufgrund der IAP-regulierenden Fähigkeiten wurden die Peptide von Smac und seinen Isoformen bereits in der experimentellen Tumorthherapie, u.a. von gynäkologischen Tumoren und Multiplem Myelom, als potentielle Wirkstoffe erprobt (Bockbrader et al., 2005; Petrucci et al., 2007; Chauhan et al., 2007).

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Da der Behandlungserfolg des malignen Melanoms bei frühzeitiger Metastasierung bislang im Wesentlichen von der Früherkennung abhängt und es von hoher Therapieresistenz begleitet wird, ist es von großem Interesse neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Das Verständnis der Apoptoseregulation des malignen Melanoms ist dabei entscheidender Grundstein für eine adäquate Therapie. Zu den Regulatoren der Apoptose zählen die antiapoptotischen Caspaseninhibitoren der Gruppe der IAPs, FLIP sowie die proapoptotischen Proteine AIF und Smac.

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung einzelner apoptotischer Regulationsprozesse im Gesamtkontext der Apoptose. Hierzu sollte einerseits die apoptotische Wirksamkeit Apoptose-induzierender Stimuli auf Melanozyten und Melanomzellen quantifiziert und andererseits deren Einfluss auf die Expression der Apoptoseregulatoren in Melanozyten und Melanomzellen untersucht und verglichen werden.

Zur Stimulation sollten die Induktoren des Rezeptor-vermittelten Apoptosesignalweges CH-11 und TNF- α sowie das körpereigene Zytokin IFN- γ und LPS verwendet und anschließend die apoptotische Wirkung quantifiziert und verglichen werden. Nach apoptotischer Stimulation, die mit CH-11 und TNF- α erfolgte, sollte die Veränderungen der Expression Apoptose-regulierender Proteine quantifiziert werden. Hauptinteresse lag hierbei bei den oben genannten antiapoptotischen Proteinen der IAP-Gruppe und FLIP sowie den proapoptotischen Proteinen AIF und Smac. Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien, die eine CD95L-Überexpression induzieren, gelegt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Webeco
Bidest-Gerät Destamat	Heraeus
CO ₂ -Inkubator	BioRad
Elektrophorese-und Blotting-Apparatur	BioRad
ELISA-Photometer	Dynatech MR5000
Entwicklungskassetten	Polaroid
Feinwaage	Sartorius
Heizblock	Techne
Magnetrührer	Monotherm, Faust
Phasenkontrastmikroskop	Olympus
pH-Meter mit Ingold-Elektrode 405	Knick
Photometer Photometer	Beckmann Pharmacia Biotech
Pipettierhilfen (manuell, elektrisch)	Hirschmann
Röntgenfilme (Hyperfilm ECL)	Amersham Pharmacia Biotech
Schüttler	Köttermann
Thermoblock	Techne Dri-Block
Thermobad	B. Braun
Transformatoren LKB-Gps 200/400	Pharmacia
Vakuum-Absaugpumpe	Medap
Vortex	Bender und Hobein
Wasserbad	B. Braun
Zentrifugen: Tischzentrifuge: Biofuge 13	Heraeus
Sorvall-Zentrifuge mit Rotoren	Du Pont
Kühlzentrifuge	Beckman Coulter

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Eppendorfgefäße	Falcon
Filterpapier 3MM	Whatman

Heparin-Spritzen	Becton Dickinson
Mikrotiterplatten (MTP) (24 well)	Falcon
Nitrozellulose-Membran (0,2 µM Porengröße)	Protran, Schleicher und Schüll
Prestained SDS-Page Standard (Broad Range)	BioRad
Spezialfilme (Hyperfilm ECL)	Amersham Pharmacia Biotech
Sterile Filter	B.Braun
Sterile Pipetten	Falcon
Zellkulturflaschen aus Polystyrol	Falcon
Zellkulturplatten (6-well-plates)	Falcon
Zellschaber	Costar
Zentrifugenröhrchen (50ml)	Falcon

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Bio-Rad
Agarose	Gibco
Aprotinin (Tyrasylo) 10% in Aqua bidest	Sigma
APS (<i>Ammoniumpersulfat</i>)	BioRad
bFGF (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)	Boehringer Mannheim
BPE (<i>Bovine pit. Extract</i>)	Gibco
Bromphenolblau	BioRad
BSA protein assay kit	Pierce
Camptothecin	Calbiochem
Cell death detection kit „ELISA PLUS“	Roche Diagnostics
Choleratoxin	Calbiochem
DMSO (<i>Dimethylsulfoxid</i>)	Sigma
Doxycyclin	ICN, Aurora, USA
Cytotoxicity detection kit (LDH)	Roche Diagnostics
EDTA (<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>)	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Formaldehyd	J.T. Baker
FCS (<i>10% fetales bovines Serum</i>)	Seromed-Biochrom
Geneticin	Gibco

Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
Human transferin	Sigma
Hydrocortison	Serva
Hygromycin	Boehringer Mannheim
Insulin	Sigma
Isopropanol	J.T. Baker
Kalziumdichlorid	Merck
Leupeptin 10µg/ml in Aqua bidest.	Sigma
Lumineszenzdetektion, ECL-Reagenzien	Amersham Pharmacia
Marker (Molekular Weight)	Bio-Rad
β-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Biochrom AG
Penicillin	Seromed
Pepstatin 0,5 mg/ml in Aqua bidest.	Sigma
PMSF 100mM in DMSO	Sigma
Ponceau S	Sigma
pTRE	Clontech
pTet-On	Clontech
pTK-Hyg	Clontech
SDS (<i>Natriumdodecylsulfat</i>)	Amresco
Streptomycin	Seromed-Biochrom
TEMED	BioRad
Tris HCl pH 7,5 (-acid)	Invitrogen
Tris(-base)	Invitrogen
Triton X-100	Sigma
Trockenmilch, fettfrei (Non-Fat Dry Milk)	BioRad
Trypsin	Seromed-Biochrom
Tween 20%	Sigma

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Calbiochem (San Diego, CA, USA) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.4 Apoptosestimulanzen

CH-11 (agonistischer Anti-CD95 Antikörper)	Immunotech
IFN- γ (<i>Interferon-γ</i>)	Boehringer Mannheim
LPS (<i>Lipopolysaccharid</i>)	Sigma
TNF- α (<i>Tumor Nekrose Faktor</i>)	Sigma

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Konzentration	Verdünnung	Firma
AIF	goat (polyclonal)	200 μ g IgG/ml	1:100	Santa Cruz
β -Aktin	mouse		1:10.000	Sigma
FLIP _{S/L}	rabbit (polyclonal)	200 μ g IgG/ml	1:200	Santa Cruz
cIAP1	goat (polyclonal)	200 μ g IgG/ml	1:200	Santa Cruz
cIAP2	rabbit (polyclonal)	200 μ g IgG/ml	1:200	Santa Cruz
Livin	mouse (monoclonal)		1:250	active motif
Smac	goat (polyclonal)	200 μ g IgG/ml	1:100	Santa Cruz
Survivin	goat (polyclonal)	200 μ g IgG/ml	1:100	Santa Cruz
XIAP	mouse (monoclonal)	250 μ g IgG/ml	1:250	BD

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-goat	1:5000	Dako
Anti-mouse	1:5000	Dako
Anti-rabbit	1:5000	Dako

2.1.6 Zellkulturen

Melanozyten-Kulturen wurden aus menschlichen Vorhäuten isoliert.

Humane Melanom-Zelllinien aus Primärtumoren: A-375 (Giard et al., 1973), Bro (Lockshin et al., 1985), JPC-298 (Aubert et al., 1993), Mel-HO (Holzmann et al., 1988).

Humane Melanom-Zelllinien aus Metastasen: Mel-2a (Bruggen et al., 1981), MeWo (Puche et al., 1977), SK-Mel-13 und SK-Mel-19 (Carey et al., 1976).

Die **Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien** SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L wurden durch stabile Transfektion des Tet-On-Plasmids (Clontech) sowie von pTRE-CD95L in die Melanomzelllinie SK-Mel-13 etabliert (Eberle et al., 2003). Die beschriebenen Tetracyclin-regulierbaren Zelllinien lagen zu Beginn der Doktorarbeit bereits im Labor vor.

Die **HeLa Cervix-Karzinomzelllinie** und die **Jurkat Leukämiezelllinie** stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

2.1.7 Nährmedien

Komplettmedium für Melanozyten: 500 ml MCDB 153; 2 mM CaCl₂ x H₂O-Lösung (147 mg in 5-10 ml Aq. inject. gelöst); 250µl Insulin-Lösung (in 8 ml Medium geben, steril filtriert); 10µl bFGF-Lösung (*basic Fibroblast Growth Factor*); 2 ml BPE (*Bovine pit. Extract*); 5 ml/5 mg Human transferin; 2,5 ml Hydrocortison 250 µg; 50 µl Choleratoxin.

Komplettmedium für die humanen Melanomzelllinien: 500 ml DMEM (Dulbecco's Mem) mit Glutamin (Gibco 1330); 50 ml FCS (10% fetales bovines Serum); 5 ml Penicillin/Streptomycin.

Medium für die Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L: 500 ml Dulbecco's Mem/Nut Mix F-12 (Ham) mit Glutamin (Gibco 1330); 5 ml Penicillin/Streptomycin; 2 ml Geneticin (50 mg/ml PBS); (500 µl Hygromycin (50 mg/ml PBS)).

Komplettmedium für die Zelllinien HeLa und Jurkat: 500 ml RPMI 1640; 50 ml FCS (10% fetales Kälberserum); 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml) (Seromed); 1,5 ml L-Glutamin.

2.1.8 Lösungen und Puffer

TBS-Lösung (10x konzentriert): Tris-HCl (pH 7,6) 50 mM; NaCl 150 mM; Aq. bidest.

Lysatpuffer zur Proteinextraktion: Tris-HCl (pH 7,6) 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; PMSF 100 µM; Leupeptin 1 µM; Pepstatin 1 µM; SDS 0,1%; Nonidet P-40 0,5%; Aprotinin (Tyrasylo) 0,1%; Aq. bidest.

Lösung für Trenngel (12%) für Elektrophorese: 4 ml 30% Acrylamidlösung (37,5:1 – Acrylamid: Bisacrylamid); 5 ml Trenngelpuffer; 0,9 ml Aq. bidest.; 10 µl TEMED; 100 µl APS; (Trenngelpuffer: 38,5 g Tris-Base, 0,64 M; 9,3 g Tris-HCl, 0,12 M ; 1 g SDS, 0,2% → pH auf 8,8).

Lösung für Sammelgel (5%) für Elektrophorese): 0,84 ml 30% Acrylamidlösung; 2,5 ml Sammelpuffer; 1,6 ml Aq. bidest.; 10 µl TEMED; 100 µl APS; (Sammelgelpuffer: 19,7 g Tris-Base, 0,33 M; 1 g SDS, 0,2% → pH 6,8).

Probenpuffer (4-fach konzentriert): 2,5 ml Tris-HCl (pH 6,8); 0,2 g SDS; 4 ml Glycin; 2 ml β-Mercaptoethanol; 4 mg Bromphenolblau; 1,5 ml Aq. bidest.

Elektrophoresepuffer: 30,4 g Tris (-base); 144 g Glycin; 10 g SDS; 2 l Aq. bidest.

Transferpuffer für Western-Blot: 5,82 g Tris (-base), 48 mM; 2,18 g Glycin, 30 mM; 0,37 g SDS; 200 ml Methanol; 800 ml Aq. bidest.

Blockierungspuffer/ 4% Magermilch-Lösung: 2 g Magermilch-Pulver; 50 ml PBS-Tween (0,05%).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Unter Anwendung der Einschicht-Zellkulturtechnik wurden humane Melanozyten und Melanomzelllinien isoliert und in Zellkulturflaschen aus Polystyrol (260 ml, 75 cm²) mit den jeweiligen Nährmedien kultiviert. Die verwendeten Primärkulturen wurden in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, wobei vor jedem Mediumwechsel die Zellen mit sterilem PBS (*Phosphate buffered saline*) gespült wurden, um sowohl tote Zellen als auch saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe einer 1% Trypsin-EDTA (*Ethylendiamintetraessigsäure*)-Lösung. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und ca. 1 Mio. Zellen erneut in Kulturflaschen ausgesät und kultiviert.

Melanozyten wurden in MCDB-Medium mit verschiedenen Melanozyten-stimulierenden Faktoren kultiviert (Yaar und Gilcrest, 1991). Melanomzellen kultivierten wir in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), das zusätzlich 10% fetales bovines Serum (FBS) beinhaltet. Die transfizierten Zelllinien wurden zusätzlich mit Geneticin bzw. plus Hygromycin behandelt. Nach Transfektion der Zelllinie SK-Mel-13 mit dem Tet-On-Plasmid wurde zur Selektion von Klonen das Antibiotikum Geneticin verwendet. Nach anschließend Kotransfektion mit dem Plasmid pTRE und pTK-Hyg kamen Geneticin und Hygromycin zum Einsatz.

Die Behandlung der Zellen mit Apoptose-induzierenden Substanzen erfolgte jeweils für 24 Stunden bei 37°C. Hier wurden folgende Substanzen verwandt: CH-11 (0,5 µg/ml), TNF-α (100 U/ml), IFN-γ (100 U/ml) und LPS (0,2 µg/ml). TNF-α, IFN-γ und LPS fanden einzeln sowie in Kombination Anwendung. Bei CH-11 handelt es sich um einen agonistischen anti-CD95-Antikörper, der vergleichbar mit CD95L den CD95-vermittelten Signalweg aktiviert.

2.2.2 Stabil transfizierte Melanomzellen

Die Transfektion ist eine Technik zur Einschleusung von Fremd-DNA in Zellen. Dabei unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile

Transfektion). Durch Abbauprozesse wird fremde DNA normalerweise schnell abgebaut, nach dem Einbau in die Wirts-DNA wird dieser Vorgang jedoch unterbunden. Von Gossen und Bujard wurde ein System entwickelt, bei dem eine Regulation der Genexpression möglich ist, das so genannte Tet-On- bzw. Tet-Off-System (Gossen und Bujard, 1992). In dieser Arbeit wurde das Tet-On-System verwendet. Mit diesem System hat man die Möglichkeit, die Expression eines gewünschten Gens zu regulieren (Gossen and Bujard., 1995). Es handelt sich um eine zweistufige Transfektion. Eine Zelllinie wird zunächst mit dem Tet-On-Plasmid transfiziert, Klone mit dem Antibiotikum Geneticin selektiert. Anschließend erfolgt eine Kontransfektion mit dem Plasmid pTRE (*tet-responsive element*), in dem sich das gewünschte Gen-Fragment eingebaut ist, und dem Plasmid pTK-Hyg. In Anwesenheit von Tetracyclin oder dessen Derivat Doxycyclin wird dann die Expression des gewünschten Gens initiiert. Durch das Plasmid pTK-Hyg, das Hygromycin-resistent ist, kann dann die doppelt-stabil transfizierte Zelllinie selektiert werden. Für die Selektion dient ein Geneticin- und Hygromycin-haltiges Medium.

Dieser Teil des Experiments wurde von Dr. Eberle durchgeführt. Die mit dem Tet-On-Plasmid stabil transfizierte Zelllinie SK-Mel-13 (SK-Mel-Tet-On) wurde anschließend mit dem Plasmid pTRE/CD95L und pTK-Hyg kotransfiziert (SKM13-CD95L). Für die Aktivierung des pTRE-Promotors wurden 2 µg/ml Doxycyclin zum Medium zugegeben.

2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurde das Zelltube schnell in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, um die Zellen anschließend in 10 ml Nährmedium aufzunehmen und als Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen zu transferieren. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 192 xg (1000 rpm, Sorvall, HS 4-Rotor) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Um eine erhöhte Reinheit der Zellen zu erlangen erfolgte die Wiederholung des Vorgangs. Anschließend wurde das Suspensat in eine 260 ml-Kulturflasche übertragen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach Absaugen des alten Nährmediums mit 10 ml PBS gespült und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gelöst. Anschließend erfolgte mit 9 ml Kulturmedium die Überführung der Zellen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen und die

Zentrifugation für 5 Minuten mit 192 xg (1000 rpm, Sorvall, HS 4-Rotor). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 3 ml Mischmedium (50% Nährmedium, 50% Serum) resuspendiert und dann 3 ml einer DMSO-Lösung (80% Nährmedium, 20% DMSO) hinzugefügt. Die Zellsuspension konnte dann in 1,8 ml-Einfrierröhrchen á 1 ml aliquotiert werden (6 Stocks). Das Einfrieren ist ein zwingend langsamer Prozess, d.h. die Röhrchen wurden in Zellstoff eingepackt zunächst zwei Tage bei -80°C eingefroren und dann erst im liquiden Stickstoff kryokonserviert.

2.2.4 Zytotoxizitätsassay

Zytotoxizität ist die Fähigkeit von Substanzen (u.a. Medikamente, Antikörper, Viren, Zytokine, Zellen des Immunsystems) Gewebezellen zu schädigen. Durch die Zerstörung der Zellmembran gelangt der Zellinhalt ins umliegende Gewebe, der dort detektiert und quantifiziert werden kann. Bestimmt werden kann die Zytotoxizität auf verschiedene Weise, beispielsweise durch die Anfärbung mit Trypan-Blau, Eosin oder Propidium-Jodid. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung der intrazellulären Laktatdehydrogenase (LDH). Hierzu wurde der von Roche Diagnostic käuflich zu erwerbende „Cytotoxicity detection Kit (LDH)“ verwendet. Die LDH-Aktivität wurde dabei in einer Zwei-Schritt-Enzymreaktion bestimmt.

Im ersten Schritt reduziert LDH durch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat NAD^+ zu NADH/H^+ . In der zweiten Enzymreaktion transferieren 2 H^+ des $\text{NADH} + \text{H}^+$ durch Diaphorase als Katalysator zum gelben Tetrazoliumsalz 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazolium, das dadurch zu Formazansalz reduziert wird. Formazansalz hat eine rötliche Farbe, dessen Intensität im ELISA-Photometer gemessen werden kann. Je höher die Zytotoxizität und somit die LDH-Menge, desto intensiver die Farbe.

Durchführung: Die zu untersuchenden Zelllinien wurden für 10 Minuten bei 200 xg (1400 rpm) zentrifugiert. Anschließend wurden je 100 μl des Überstandes in Eppendorfgefäße pipettiert. Als Positiv-Kontrolle diente der Überstand von Zellen, die für 1 Stunde mit 1% Triton X-100 inkubiert und erneut zentrifugiert wurden. Die Zellüberstände sowie die Positiv-Kontrollen wurden in einer Verdünnung mit PBS von 1:10 (10 μl Zellüberstand, 90 μl PBS), unter Berücksichtigung einer Negativ-Kontrolle

reinen PBS, auf eine Mikrotiterplatte (MTP) aufgetragen. Hinzugefügt wurden dann je 100 µl einer Mischung aus den zwei Lösungs-Komponenten NADH und Pyrat. Es folgte eine 30-minütige lichtgeschützte Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Anschließend konnte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm erfolgen. Der Positiv-Kontrollwert wurde 100% gleichgesetzt und die übrigen Werte im Verhältnis zu diesem Wert berechnet. Die relativen Zytotoxizitätsraten ergaben sich aus dem Vergleich zu den Zytotoxizitätswerten der unbehandelten Zellen derselben Zelllinie.

2.2.5 Apoptoseassay

Der Prozess der Apoptose kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Ein relativ zuverlässiges Verfahren ist die Messung der DNA-Fragmentation, die ein irreversibler Schritt der Apoptose darstellt. Endogene Endonukleasen, die am Ende der apoptotischen Signalkaskaden entstehen, spalten die DNA an den zugänglichen Stellen, so dass Mono- und Oligonukleosomen entstehen. Zur Bestimmung dieser Fragmente wurde der käuflich zu erwerbende Kit „Cell death detection ELISA PLUS“ von Roche Diagnostics benutzt. Das Assay basiert auf einem quantitativen Antigen-Antikörper-Prinzip. Dabei richten sich monoklonale Antikörper von Mäusen gegen menschliche DNA und Histone, was die spezifische Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen zulässt.

Auf einer Streptavidin-bedeckten MTP wird nach Zugabe eines Zelllysates eine Mischung aus Anti-Histon-Biotin-Antikörpern und Peroxidase-gekoppelte-Anti-DNA-Antikörpern aufgetragen. Während einer Inkubationsperiode binden dann die Anti-Histon-Antikörper die Histon-Komponenten der Nukleosomen. Gleichzeitig bildet sich durch Biotinylation ein Immunkomplex mit der Streptavidin-bedeckten MTP. Zusätzlich bindet Anti-DNA-Peroxidase an die DNA-Komponenten der Nukleosomen. Ungebundene Antikörper werden durch einen Waschvorgang beseitigt. Anschließend kann die Menge an Nukleosomen, die durch die Peroxidase in einem Immunkomplex zurückgehalten wurde, quantitativ bestimmt werden. Durch Zugabe von ABTS als Substrat, das eine grüne Farbe bildet, kann die Peroxidasen-Menge photometrisch gemessen werden. Je stärker die Apoptose, desto mehr Nukleosomen werden gebunden und zeigen eine stärkere Farbentwicklung.

Durchführung: Die zu untersuchenden kultivierten Zelllinien wurden für 10 Minuten bei 200 xg (1400 rpm) zentrifugiert. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde den Zellen Lysatpuffer zugeführt und für 30 Minuten bei 250 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 xg (1400 rpm) wurden 19 µl jeder zu untersuchenden Zelllinie auf eine MTP übertragen. Zusätzlich wurden eine Kit-eigene positiv-Kontrolle und eine negativ-Kontrolle reinen Mediums aufgetragen. Nach Zugabe von 75 µl eines Immunreagenz erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur und 300 rpm die Inkubation. Nach der Entfernung der Lösung wurde drei Mal mit je 250 µl Inkubationspuffer gewaschen. Für die Farbreaktion mußte 100 µl Kit-eigener Substratpuffer hinzu pipettiert und lichtgeschützt 15 Minuten bei 250 rpm geschüttelt werden. Anschließend erfolgte mit einer Wellenlänge von 405 nm die Messung der Adsorption mittels Photometer. Der Positiv-Kontrollwert wurde 100% gleichgesetzt und die übrigen Werte im Verhältnis zu diesem Wert berechnet. Die relativen Apoptoseraten ergaben sich aus dem Vergleich zu den Apoptosewerten der unbehandelten Zellen.

2.2.6 Proteinextraktion

Nach der Konfluenzbestimmung der Zellkulturen wurde das Kulturmedium aus den Kulturflaschen entfernt und in Plastikzentrifugenröhrchen gesammelt. Die Kulturflaschen wurden auf Eis gestellt, die Zellen mit 0,4 ml Lysatpuffer lysiert. Mit Hilfe eines Zellkratzers musste das Zelllysate gesammelt und mit einer Eppendorfpipette in die vorbereiteten abgekühlten Eppendorfgefäße überführt und anschließend mit 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert werden. Nach Absaugung der Überstände wurde das Zellpellet erneut mit PBS gewaschen und zentrifugiert, das zurückbleibende Zellpellet ebenfalls unter Zugabe von 100 µl Lysatpuffer lysiert und mit dem Zelllysate zusammengeführt. Um eine Proteindegradation zu vermeiden, wurden die Lysate ständig gekühlt. Dann erfolgte unter Zuhilfenahme einer Insulinspritze, mit der die im Lysate vorhandenen Nukleinsäuren 10-15 mal durch die Kanüle geschert wurden, und anschließender Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (10.000 rpm) die Trennung der mitochondrialen und membranösen von der zytosolischen Fraktion. Die zytosolischen Überstände wurden in kleinen Mengen (100 µl) in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.7 Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode ist die Biuret-Reaktion, bei der die Aminosäuren in alkalischem Medium Kupfer (II)-Kationen zu Kupfer(I)-Kationen reduzieren und Kupfer(I)-Kationen dann mit zwei Molekülen der Bicinchoninic-Säure (BCA) einen stabilen Chelat-Komplex mit violetter Farbumschlag bildet. Die Messung erfolgte bei einer maximalen Absorption von 562 nm.

Durchführung: Zur Eichung diente eine Verdünnungsreihe mit BSA-Serum mit 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 und 0 µg/ml BSA, die parallel zu den zu untersuchenden Proben auf eine MTP aufgetragen wurde. Die Verdünnungsreihe entstand aus einer 2 mg/ml BSA-Stammlösung und Lysatpuffer.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit Lysatpuffer in einer Verdünnung von 1:10 (5 µl Probe, 45 µl Lysatpuffer) und ebenso wie die Verdünnungsreihe mit jeweils 10 µl dreimal auf die MTP aufgetragen. Das aktive Reagenz musste aus den Kit-eigenen Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt werden, bevor jeweils 200 µl zu den Proben und der Verdünnungsreihe pipettiert wurden. Die Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C verursachte durch die reaktiven Gruppen eine Farbreaktion, die photometrisch bei 562 nm vermessen werden konnte. Nach dem Erstellen einer Standard-Protein-Kurve wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.2.8 Elektrophoretisches Verfahren (SDS-Protein-Gelelektrophorese)

Eine Auftrennung und Analyse von Proteinen durch Elektrophorese kann entweder in freier Lösung oder in einem Trägermedium erfolgen. Die Proteine wandern aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen im elektrischen Feld, wobei die Wanderung durch ihre Nettoladung, Größe und Gestalt bestimmt wird. Bei der SDS-Protein-Gelelektrophorese sind alle Proteine negativ geladen und wandern zur Anode.

Fast alle analytischen Elektrophoresen von Proteinen werden in hochvernetzten Polyacrylamidgelen durchgeführt, die durch Polymerisierung aus Monomeren hergestellt werden. In dieser Arbeit wurde die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), eine von Laemmli (Laemmli, 1970) modifizierte Methode, angewandt. Es wurden dafür 12%ige Polyacrylamid-Gele als Trenngel

verwendet, dem ein 4%iges Polyacrylamid-Sammelgel aufgeschichtet wurde, dessen Taschen zum Auftragen der Proteinproben dienten. Durch Variation des Vernetzungsgrades kann die Porengröße des Gels so eingestellt werden, dass sich eine optimale Auftrennung der Proteine ergibt. Die Proteine wurden dabei in SDS, einem negativ geladenen Detergenz gelöst, das an die Proteine bindet, so dass Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Lipiden aufgehoben wurden. Zur Spaltung der Disulfidbrückenbindungen wurde Mercaptoethanol hinzugefügt. Die aufgrund der Komplexierung einheitlich negativ geladenen Proteine wandern bei der Elektrophorese durch das Polyacrylamidgel in Richtung der positiven Elektrode.

Zunächst wurden bei einer Temperatur von 4°C unter einer konstanten Spannung von 80 V die Proteine in das Sammelgel transferiert, bevor unter einer Spannung von 120 V die Auftrennung des Proteingemisches im Trenngel erfolgte. Da kleine SDS-Proteinkomplexe schneller durch die Poren des Polyacrylgels gleiten (Molekularsiebeffekt), werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, d.h. die niedrigmolekularen Proteine sind nach Abschluss der Elektrophorese der Anode am nächsten. Sichtbar gemacht werden die aufgetrennten Proteine durch Farbstoffe wie Coomassie Blau oder mit einer hochempfindlichen Silberfärbung.

Neben den zu analysierenden Proben wurde ein Gemisch von Proteinen mit bekannten Molekulargewichten aufgetrennt. Die Laufstrecken der einzelnen Markerproteine lieferten eine Eichgerade, die zur Bestimmung der Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine diente. Molekulargewichte werden in Dalton (D) oder kilo-Dalton (kD) angegeben (1 Dalton entspricht der Masse des Wasserstoffatoms).

Präparation der Proteinproben:

Pro Gel-Tasche wurden insgesamt 60 µg Gesamtprotein aufgetragen. Diese Menge wurde mit Lysatpuffer auf 21 µl aufgefüllt und im Verhältnis 3:1 mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer (7 µl) versehen. Die Proben wurden zentrifugiert, für 5 Minuten im Thermoblock bei 95°C erhitzt und erneut kurz zentrifugiert. Anschließend konnten sie dann mit einer Hamiltonspritze vorsichtig auf das Polyacrylamid-Sammelgel aufgetragen werden.

2.2.9 Western-Blot

Der Western-Blot ist ein Verfahren bei dem die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert werden und dort detektiert werden können. Die Gesamtheit der Proteine kann mit bestimmten Farbstoffen wie Coomassie Blue oder Ponceau S unspezifisch markiert werden. Die einzelnen Proteinbanden können mit Hilfe spezifischer Antikörper (monoklonal oder polyklonal), die auf der Membran an die entsprechende Proteinbande binden, identifiziert werden. Über die spezifischen primären Antikörper können Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper binden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschschriffe mit Puffern, die Detergentien enthalten, wieder entfernt. Anschließend kann mit Hilfe eines Chemolumineszenzreagenz, das durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzt wird, das emittierte Lumineszenzlicht auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Durchführung:

Die Western-Blot-Kammer wurde so ausgerichtet, dass das Gel zur Kathode und die Nitrozellulose-Membran zur Anode hin lagen. An den Außenseiten waren je zwei Filterpapiere und ein Schwamm positioniert. Dazu wurden die Membran und die Filterpapiere vorher auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und im Blotpuffer luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der Western-Blot, die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran, erfolgte dann über 90 Minuten bei konstanter Spannung von 100 V. Dabei wurde die Kammer zum Abfangen der Wärme auf Eis gestellt. Zur Überprüfung des Transfers der Proteine konnte die Membran mit Coomassie Blue oder Ponceau S eingefärbt werden. Diese Färbung ist reversibel, die Membran kann anschließend mit PBS-Tween wieder vollständig entfärbt werden. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Schale mit 5% fettfreier Trockenmilch inkubiert.

2.2.10 Antikörperinkubation

Die Nitrozellulose-Membranen wurden nach dem Western-Blot bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert. Je nach Antikörper wurde, bei einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden, der Blockierungspuffer in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 bis 1:1000 hinzugefügt. Nachdem die Membran mehrmals (3x 5 Minuten) mit PBS-Tween

gewaschen wurde, erfolgte für eine weitere Stunde die Inkubation mit dem in 5% Trockenmilch 1:5000 verdünntem sekundären Antikörper, dem sich ein erneut mehrmaliges Waschen mit PBS-Tween anschloß.

Die Chemolumineszenzdetektion erfolgte mit ECL-Reagenzien von Amersham-Pharmacia. Sie wurden zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 Minute konnte die Membran, luftblasenfrei zwischen zwei Folien, gemeinsam mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) in eine Filmkassette gespannt werden. Je nach Intensität des Signals wurden die Filme von wenigen Sekunden bis zu 24 Stunde in den Filmkassetten exponiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Films im Entwicklungsautomaten. Anhand der Laufstrecken der Markerproteine konnte in Höhe des entsprechenden Molekulargewichtes die Proteinexpression untersucht werden. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurden regelmäßig Inkubationen mit Aktin-Antikörpern durchgeführt.

2.2.11 statistische Auswertung

Bei der Auswertung der Messwerte wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Student's T-Test wurden mit dem Microsoft-Programm Excel errechnet. Zur semiquantitativen Analyse der lumineszierenden Signale der Western Blots wurde das Programm TINA verwandt.

Der t-Test ist ein Begriff aus der mathematischen Statistik, der eine Gruppe von Hypothesentests bezeichnet. Oft ist jedoch mit dem t-Test der Einstichproben- bzw. Zweistichproben t-Test gemeint. Der hier verwandte Zweistichproben t-Test prüft anhand der Mittelwerte zweier Stichproben, ob die Erwartungswerte zweier Grundgesamtheiten gleich, kleiner oder größer sind. Bei zwei unabhängigen Stichproben ergeben sich die folgenden Hypothesen:

$$H_0 : \mu_x = \mu_y$$

$$H_1 : \mu_x \neq \mu_y$$

Bei der Untersuchung zweier Stichproben mit ungleichen Varianzen fand folgende Berechnungsformel Anwendung:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{(s_x^2 + s_y^2)/n}}$$

Der kritische Wert α ist 0,05, so dass bei einem kleineren Wert die H_0 -Hypothese verworfen und von einem signifikanten Ergebnis gesprochen werden kann.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von CH-11, TNF- α , IFN- γ und LPS auf die Apoptose von Melanozyten und Melanomzellen

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Apoptose in Melanozyten und Melanomzellen durch Stimulation mit CH-11, TNF- α , IFN- γ und LPS beeinflusst werden kann, wurden die Zellen für 24 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert.

Bei CH-11 handelt es sich um einen agonistischen anti-CD95-Antikörper, der vergleichbar mit CD95L den CD95-vermittelten Signalweg aktiviert. IFN- γ koordiniert durch transkriptionelle Regulation immunologisch relevante Gene verschiedener zelluläre Abläufe und entfaltet so eine immunstimulierende, vor allem antivirale und antitumorale Wirkung (Schröder und Jaster, 2004). Lipopolysaccharide (LPS) sind relativ thermostabile Verbindungen der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, die beim Zerfall als Endotoxine wirken. Sie sind in der Lage eine akute Phase Reaktion, Fieber und septischen Schock zu verursachen (Andersson et al., 1992). Sie aktivieren über einen Komplex mit dem Lipopolysaccharid-bindenden-Protein (LBP), Membranprotein CD14 und Tolllike-Rezeptoren den Transkriptionsfaktor NF- κ B und somit die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und TNF- α (Dobrovolskaia et al., 2002). TNF- α , IFN- γ und LPS in Kombination hatten bereits in vorangegangenen Untersuchungen eine starke proapoptotische Wirkung gezeigt (Fecker et al., 2002).

Die Apoptoserate der Zellen wurde nach Inkubation mit Hilfe eines „Cell death detection“-ELISAs bestimmt. Parallel dazu erfolgte anhand der aus den Zellen freigesetzten Lactatdehydrogenase-Aktivität die Quantifizierung der Zytotoxizität. Zur Beurteilung der Eigenschaften von CD95L-überexprimierenden Zellen wurde die Aktivierung des pTRE-Promotors in Zellen des Klons SKM13-CD95L-Tet-On durch Zugabe von Doxycyclin erreicht. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem Student's T-Test des Microsoft-Programms Excel.

3.1.1 Verdopplung der Apoptose in Melanozyten durch Stimulation mit CH-11

Zur Analyse der durch CH-11 und TNF- α induzierten Apoptose wurden vier Melanozytenkulturen (NHM-1-4) und sieben Melanomzelllinien (A-375, Bro, Mel-HO, Mel-2a, MeWo, SK-Mel-13 und SK-Mel-19) untersucht.

Bei normalen humanen Melanozyten zeigte sich nach Behandlung mit CH-11 eine Verdopplung der Apoptose (rel. Apoptose 2,5; SD 0,6; $p=0,007$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit TNF- α zeigte dahingegen keine signifikante apoptotische Wirkung (1,5; SD 0,7; $p=0,19$). Die Messungen der Zytotoxizität ergaben keine signifikanten Veränderungen (siehe Abb 3.1).

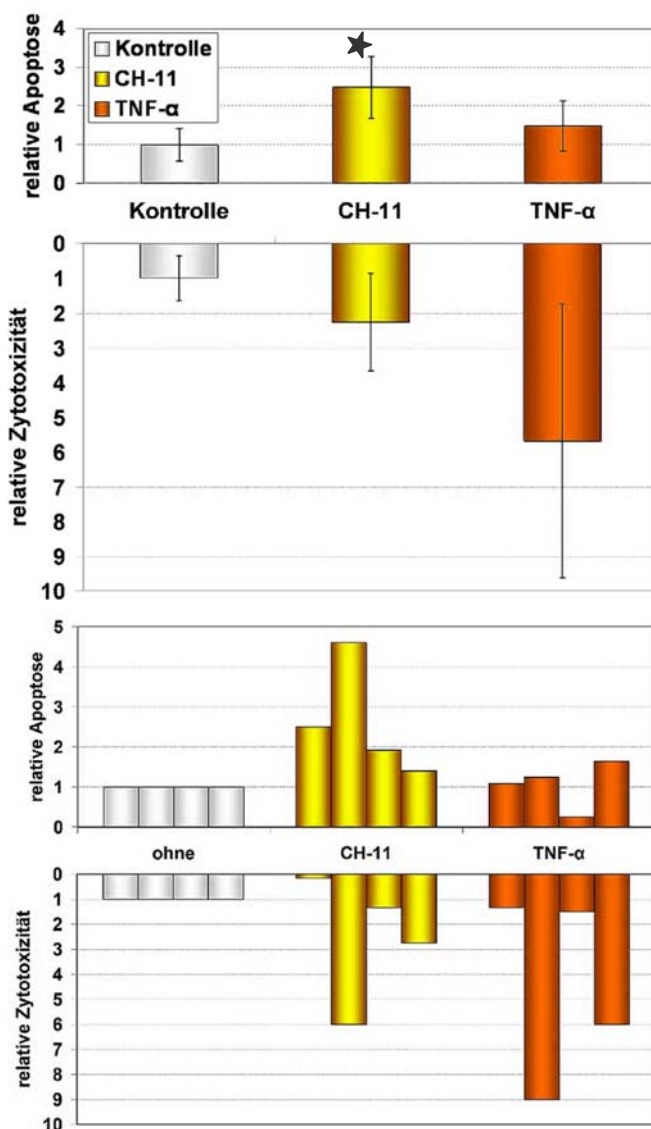


Abb. 3.1: Verdopplung der Apoptose durch CH-11 bei normalen humanen Melanozyten. Normale humane Melanozyten (NHM) wurden 24 Stunden mit CH-11 und TNF- α stimuliert. Anschließend wurde mit Hilfe eines „Cell death detection“-ELISAs die Apoptose und mit Hilfe eines LDH-Assays die Zytotoxizität bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte NHM, deren Apoptose- und Zytotoxizitätswerte dem Wert 1 gleichgesetzt wurden. **Obere Abb.:** Dargestellt sind die Mittelwerte und dazu gehörenden Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Untersuchungen mit jeweils drei oder mehr Einzelmessungen. Oben: relative Apoptose. Unten: relative Zytotoxizität. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet. **Untere Abb.:** Dargestellt sind die Einzelwerte einer Untersuchungsserie. Oben: relative Apoptose. Unten: relative Zytotoxizität.

Für die Untersuchung der Apoptoseinduktion durch CH-11 in Melanomzellen wurden die Zelllinien A-375, Mel-2a, Mel-HO, MeWo und SK-Mel-13 ausgewählt. Diese wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits als CH-11-sensitiv (A-375, Mel-HO, SK-Mel-13) oder CH-11-resistent (Mel-2a, MeWo, SK-Mel-28) charakterisiert (Raisova et al., 2000).

Nach 24-stündiger Inkubation mit CH-11 zeigten sich die Melanomzelllinien A-375 (11,4 +/- 1,2; $p < 0,001$), Mel-HO (1,8 +/- 0,1; $p < 0,001$) und SK-Mel-13 (1,6 +/- 0,1; $p = 0,005$) als CH-11 sensitiv, während die Zelllinien Mel-2a (1,1 +/- 0,5) und MeWo (0,9 +/- 0,3) CH-11 resistent waren. Bei diesen Untersuchungen wurden Melanomzelllinien mit relativen Apoptosewerten über 1,5 als sensitiv gegenüber CH-11 gewertet. Mit dem T-Test wurde die Signifikanz überprüft. Die Melanomzelllinien verhielten sich somit ähnlich wie in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Raisova et al., 2000).

Bei der Untersuchung der Zytotoxizität fiel in allen Zelllinien ein tendenziell reduziertes zytotoxisches Verhalten auf, wobei dieses nur in der Melanomzelllinie Mel-2a signifikant war (0,3 +/- 0,2; $p = 0,006$) (siehe Abb. 3.2).

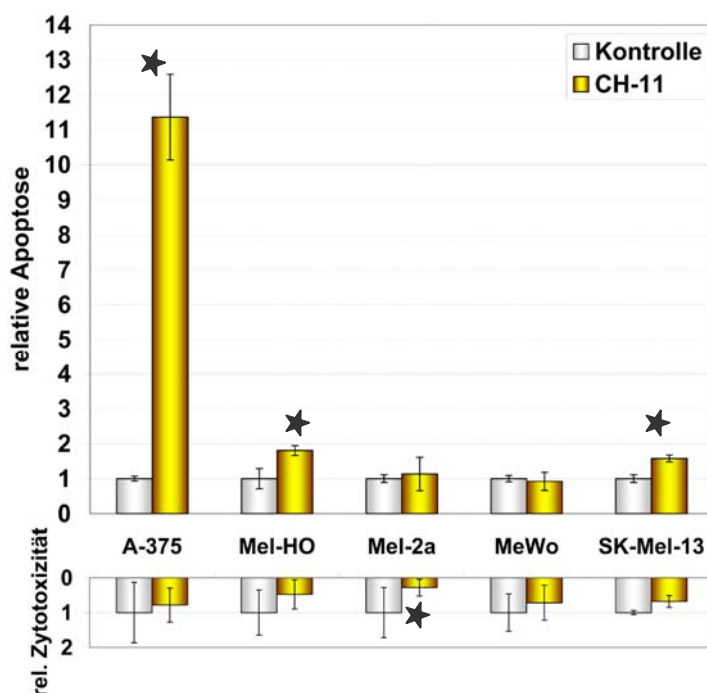


Abb. 3.2: Induzierbarkeit der Apoptose und Verminderung der Zytotoxizität in Melanomzellen durch CH-11. Die Melanomzellen wurden jeweils für 24 h mit CH-11 inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines „Cell death detection“-ELISAs die Apoptose und mit Hilfe eines LDH-Assays die Zytotoxizität bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen derselben Zelllinien, deren Apoptose- und Zytotoxizitätswerte dem Wert 1 gleichgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen von drei in gleicher Art ausgeführten Experimenten mit jeweils drei Einzelmessungen. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Auch gegenüber der Apoptosestimulation mit TNF- α zeigten sich sensitive und resistente Melanomzelllinien für den apoptotischen Stimulus, wobei zwischen schwach sensitiven und stark sensitiven Zelllinien unterschieden werden konnte. Als stark sensitiv wurden relative Apoptosewerte über 2 gewertet. Zu den stark sensitiven

Zelllinien gehören in absteigender Reihenfolge der Sensitivität die Melanomzelllinien SK-Mel-19 (4,1 +/- 1,2; p=0,001), Mel-HO (3,6 +/- 1,4; p<0,001) sowie SK-Mel-13 (3,1 +/- 0,2) und A-375 (3 +/- 1,2; p=0,01). Schwach sensitiv zeigte sich Bro (1,6 +/- 0,15). Für die Zelllinien Mel-2a und MeWo wurden im T-Test keine signifikanten Veränderungen deutlich. Ein zytotoxischer Einfluss zeigte TNF- α bei Melanomzelllinien nicht (siehe Abb. 3.3).

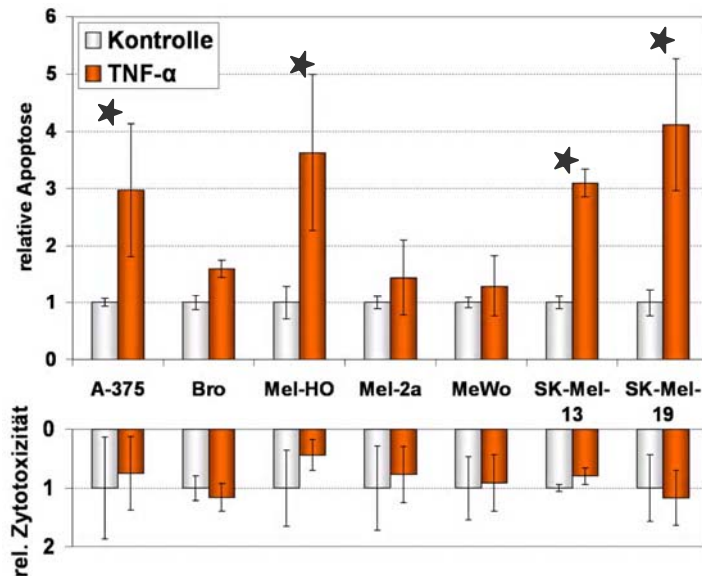


Abb. 3.3: Induzierbarkeit der Apoptose in Melanomzelllinien durch TNF- α . Melanomzellen wurden jeweils für 24 h mit TNF- α inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines „Cell death detection“-ELISAs die Apoptose und mit Hilfe eines LDH-Assays die Zytotoxizität bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen derselben Zelllinie, deren Apoptose- und Zytotoxizitätswerte dem Wert 1 gleichgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen von mind. zwei in gleicher Art ausgeführten Experimenten mit jeweils drei Einzelmessungen. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.1.2 Starke Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch Stimulation mit IFN- γ , LPS und TNF- α in Kombination

In unserer Arbeitsgruppe wurden im Rahmen einer Untersuchung zur iNOS-Expression verschiedene Melanozyten und Melanomzellen mit IFN- γ , LPS und TNF- α behandelt. In NHM und zwei (SK-Mel-19, O-Mel-2) von sechs Melanomzelllinien konnte nach Behandlung mit IFN- γ , LPS und TNF- α eine gesteigerte Apoptoserate nachgewiesen werden (Fecker et al., 2002).

Zur genauen Differenzierung der apoptotischen Wirksamkeit der einzelnen Zytokine und LPS wurde hier eine Untersuchung vorgenommen, bei der die Melanomzelllinien Bro, Mel-HO, Mel-2a, MeWo und SK-Mel-19 jeweils für 24 h mit IFN- γ , LPS oder TNF- α einzeln sowie in deren Kombination behandelt wurden. Alle untersuchten Zelllinien reagierten auf die Behandlung mit IFN- γ und der Kombination aus IFN- γ , LPS und TNF- α mit Apoptose, wobei die stärksten Apoptosewerte nach der Kombinationsbehandlung

zu messen waren. Stark sensitiv zeigten sich die Zelllinien Mel-HO und SK-Mel-19 (siehe Abb. 3.4).

In Mel-HO könnte es sich bei der Kombinationsbehandlung ($25,5 \pm 8,7$; $p < 0,001$) um einen verstärkten Effekt der Behandlung mit IFN- γ ($9,3 \pm 4,2$; $p < 0,001$) und TNF- α ($3,6 \pm 1,4$; $p < 0,001$) handeln. Auch die Zelllinie SK-Mel-19 zeigte eine starke apoptotische Reaktion durch die Kombinationsbehandlung ($8,6 \pm 3,7$; $p < 0,01$), wobei dies hier eher einem additiven Effekt der Behandlung mit TNF- α ($4,1 \pm 1,2$; $p < 0,01$) und IFN- γ ($2,5 \pm 0,9$; $p = 0,01$) entspricht. Eher geringfügige Veränderungen in den Apoptoseraten fanden sich bei den Zelllinien Bro, Mel-2a und MeWo. LPS zeigte bei der Einzelanwendung in keiner Zelllinie eine apoptotische Wirkung.

Zu einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität kam es nach der Kombinationsbehandlung mit IFN- γ , LPS und TNF- α in den Melanomzelllinien Bro ($1,3 \pm 0,2$; $p = 0,01$) und MeWo ($1,9 \pm 0,1$; $p = 0,001$). LPS hatte lediglich auf die Zelllinien Bro ($1,3 \pm 0,1$; $p = 0,01$) und SK-Mel-19 ($2,0 \pm 0,2$; $p = 0,01$) einen signifikanten zytotoxischen Effekt. Weitere signifikante zytotoxische Effekte ließen sich durch IFN- γ in der Melanomzelllinie Bro ($1,3 \pm 0,2$; $p = 0,03$) und Mel-HO ($1,7 \pm 0,3$; $p = 0,01$) auslösen. Durch TNF- α kam es zu keinem zytotoxischen Effekt (siehe Abb. 3.4).

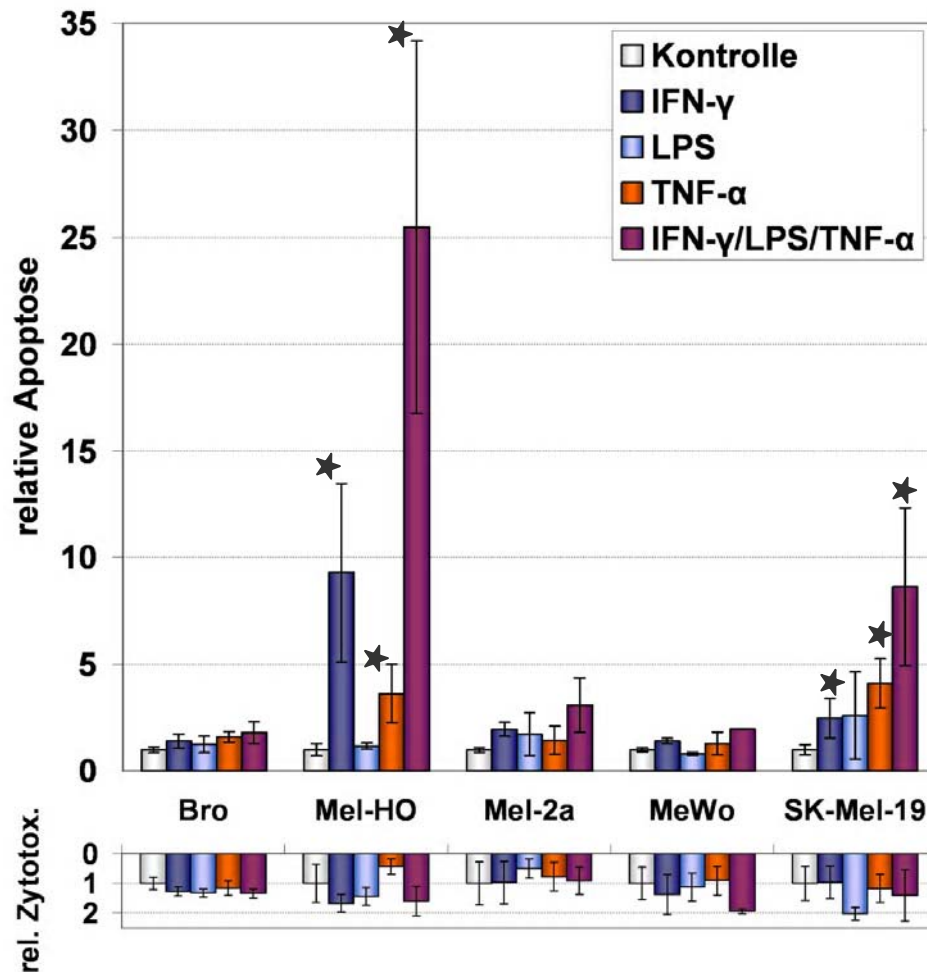


Abb. 3.4: Starke Apoptoseinduktion durch die Stimulation mit IFN- γ , LPS und TNF- α . Die Melanomzelllinien wurden für 24 h entweder mit IFN- γ , LPS oder TNF- α behandelt sowie parallel dazu mit allen drei Substanzen. Anschließend wurde mit Hilfe eines „Cell death detection“-ELISAs die Apoptose und mit Hilfe eines LDH-Assays die Zytotoxizität bestimmt. Angegeben ist jeweils die relative Apoptose- bzw. Zytotoxizitätsrate bezogen auf den Kontrollwert ohne Behandlung, die gleich 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen von drei in gleicher Art ausgeführten Experimenten mit jeweils drei Einzelmessungen. Signifikante Ergebnisse mit starker Apoptoseinduktion sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.1.3 Verlust der Sensitivität für CH-11 und TNF- α im Tet-On-Zellklon SKM13-CD95L

Um die Auswirkungen der CD95L-Überexpression auf die Apoptoseregulation von Melanomzellen zu untersuchen, wurde die Zelllinie SK-Mel-13 verwendet.

Für SK-Mel-13 konnte in dieser Arbeit nach der Behandlung mit CH-11 und TNF- α bereits eine signifikante Apoptosesteigerung gezeigt werden. Der Zellklon SK-Mel-13-Tet-On zeigte ein vergleichbares Verhalten wie die Ursprungszelllinie. Durch die Stimulation mit CH-11 (2,3 +/- 0,3; p=0,05) als auch mit TNF- α (2,7 +/- 0,2; p=0,02) konnte eine Steigerung der Apoptose nachgewiesen werden. Bei der doppelt

transfizierten Zelllinie SKM13-CD95L, die im Vergleich zu SK-Mel-13-Tet-On zusätzlich mit dem Plasmid pTRE-CD95L stabil transfiziert ist, wurde ein Verlust der Apoptoseinduzierbarkeit durch CH-11 und TNF- α deutlich. Demgegenüber konnte die Behandlung des Zellklons mit Doxycyclin, das zur Aktivierung des pTRE-Promotors für CD95L führt, die Apoptose wieder induzieren. Durch Doxycyclin kommt es bei diesem Zellklon zum Anschalten des Tet-On-Systems und zur Expression von CD95L. Dies hatte eine signifikante Steigerung der basalen Apoptoserate um ca. den Faktor 4 zu Folge (3,7 \pm 0,5; $p < 0,001$). Zusätzliche Stimulation durch CH-11 (3,3 \pm 0,2) und TNF- α (4,3 \pm 0,4) führte nicht mehr zu einer Steigerung der Apoptoserate.

Lediglich TNF- α führte in den beiden SK-Mel-13-Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L zu erhöhten Zytotoxizitätswerten, die jedoch keine Signifikanz ergaben. Durch die Gabe von Doxycyclin kam es zu einer signifikanten Abnahme der zytotoxischen Wirkung von TNF- α (0,4 \pm 0,1; $p = 0,008$) (siehe Abb. 3.5).

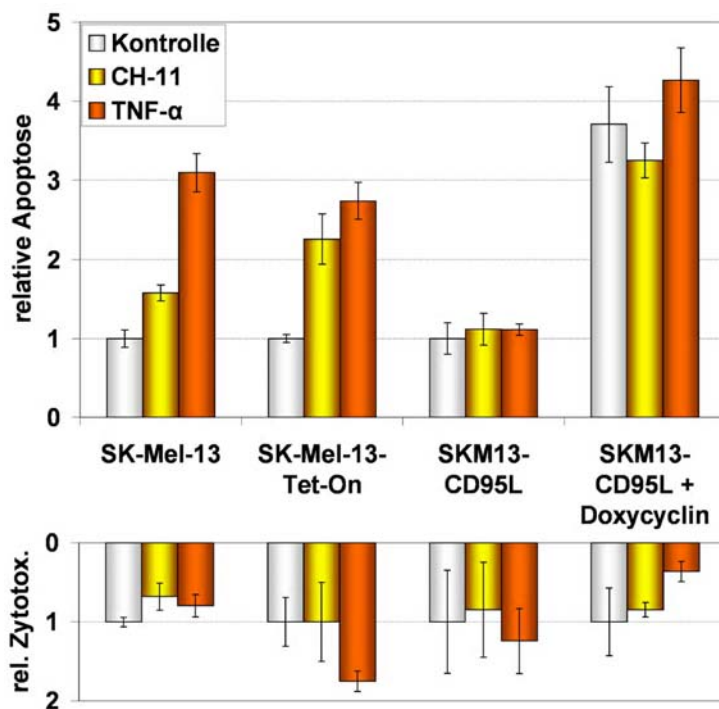


Abb. 3.5: Verlust der Sensitivität für CH-11 und TNF- α im Tet-On-Zellklon SKM13-CD95L. Die Zelllinien SK-Mel-13, SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L wurden jeweils für 24 h mit CH-11, TNF- α und Doxycyclin inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des „Cell death detection“-ELISAs die Apoptose und mit Hilfe eines LDH-Assays die Zytotoxizität bestimmt. Angegeben sind jeweils die relative Apoptose- und Zytotoxizitätsrate bezogen auf die Kontrollwerte ohne Behandlung, die gleich 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen von zwei in gleicher Art ausgeführten Experimenten mit jeweils drei Einzelmessungen.

3.2 Expressionsanalyse von Regulatoren der Apoptose in Melanozyten und Melanomzellen

Die antiapoptotischen Proteine der Gruppe der IAPs, zu denen XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin und Livin gehören, sowie FLIP als auch die proapoptotischen Proteine AIF und Smac stellen wichtige Regulatoren der Apoptose dar, deren Dysregulation den Apoptoseprozess stören kann.

Um die Frage der Beeinflussung dieser Proteine durch externe Stimuli zu beantworten, wurde zunächst die basale Expression der Proteine in drei Melanozytenkulturen (NHM-A1,-A2 und -O2) sowie sechs Melanomzelllinien (A-375, JPC-298, Mel-HO, Mel-2a, MeWo und SK-Mel-13) untersucht. Anschließend folgte dann die Analyse der Expressionsveränderungen durch Stimulation der Zellkulturen mit CH-11 und TNF- α . Ein weiteres Interesse bestand an den Veränderungen der Expression der pro- und antiapoptotischen Proteine in den SK-Mel-13-Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95. Auch hier wurde der Einfluss von CH-11 und TNF- α untersucht. Zusätzlich kam Doxycyclin zum Einsatz, dass bei der doppelt transfizierten Zelllinie SKM13-CD95 das Tet-On-System anschaltet und die Expression des Gens für den CD95-Liganden initiiert. Die Substanzen fanden in denselben Konzentrationen wie bei der Analyse der Apoptose Anwendung.

3.2.1 Verstärkte Expression von XIAP in Melanomzellen

XIAP zeigte eine sehr konstante Expression in allen melanozytären Zellen, wobei sich in Melanomzelllinien eine Tendenz zur stärkeren Expression fand (rel. Expressionsfaktor 1,4 (normiert auf 1); SD 0,2) als bei den Melanozyten (rel. Expressionsfaktor 1; SD 0,3), jedoch keine Signifikanz aufwies ($p=0,2$) (siehe Abb. 3.6). Die Normierung erfolgte gegen die β -Aktin-Werte. Auch die Behandlung mit CH-11 und TNF- α ergab sich in Melanozyten und Melanomzellen eine konstante XIAP-Expression. Weder in den Melanozyten noch in den 6 untersuchten Melanomzellkulturen ließen sich nach Behandlung Expressionsveränderung von XIAP finden (siehe Abb. 3.7).

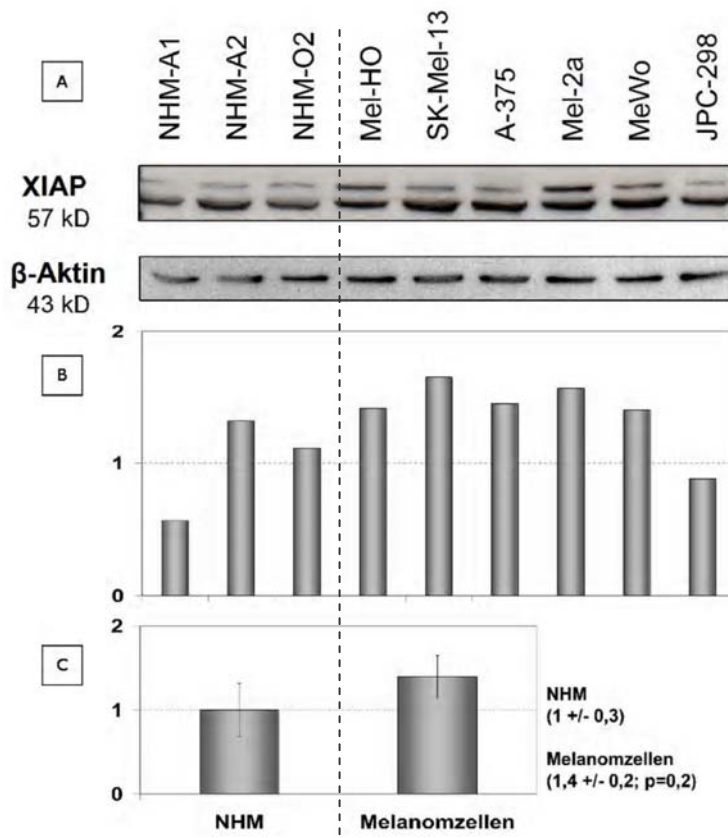


Abb. 3.6: Verstärkte Expression von XIAP in Melanomzellen. **A:** Western-Blot-Analyse von XIAP in drei Melanozyten- und sechs Melanomzelllinien. Der XIAP-Antikörper mit einer Konzentration von 250 μ g IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:250 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. **B:** Semiquantitative Analyse der illumineszierenden Signale der in A abgebildeten Western Blots mit Hilfe des TINA-Programms. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. **C:** Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von XIAP in Melanozyten und Melanomzellen. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. Die sagittal gestrichelte Linie dient der optischen Trennung von Melanozyten und Melanomzellen.

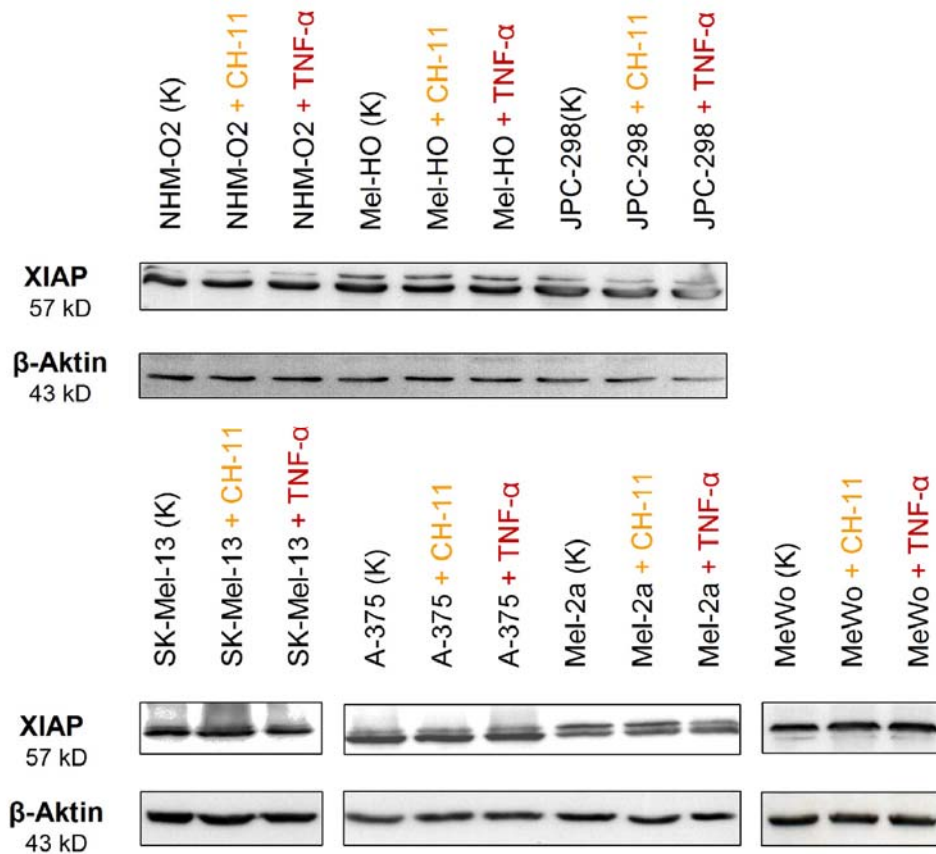


Abb. 3.7: Western-Blot-Analyse von XIAP nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurde jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der XIAP-Antikörper mit einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde in einer Verdünnung von 1:250 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.2.2 Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien

Auch cIAP1 wird in allen untersuchten Melanozyten und Melanomzelllinien exprimiert, wobei eine geringfügig stärkere Expression in Melanomzellen vorzuliegen scheint. Die stärkste Expression zeigte sich in den Melanomzelllinien A-375 und MeWo, wobei sich diese Vergleiche in den Kontrollen nicht reproduzieren ließen. Zwischen unbehandelten und stimulierten Zellen ließ sich kein Unterschied der cIAP1-Expression finden. Sowohl die Melanozyten als auch die 6 untersuchten Melanomzelllinien zeigten nach Behandlung mit CH-11 und TNF- α keine Expressionsveränderungen von cIAP1 (siehe Abb. 3.8).

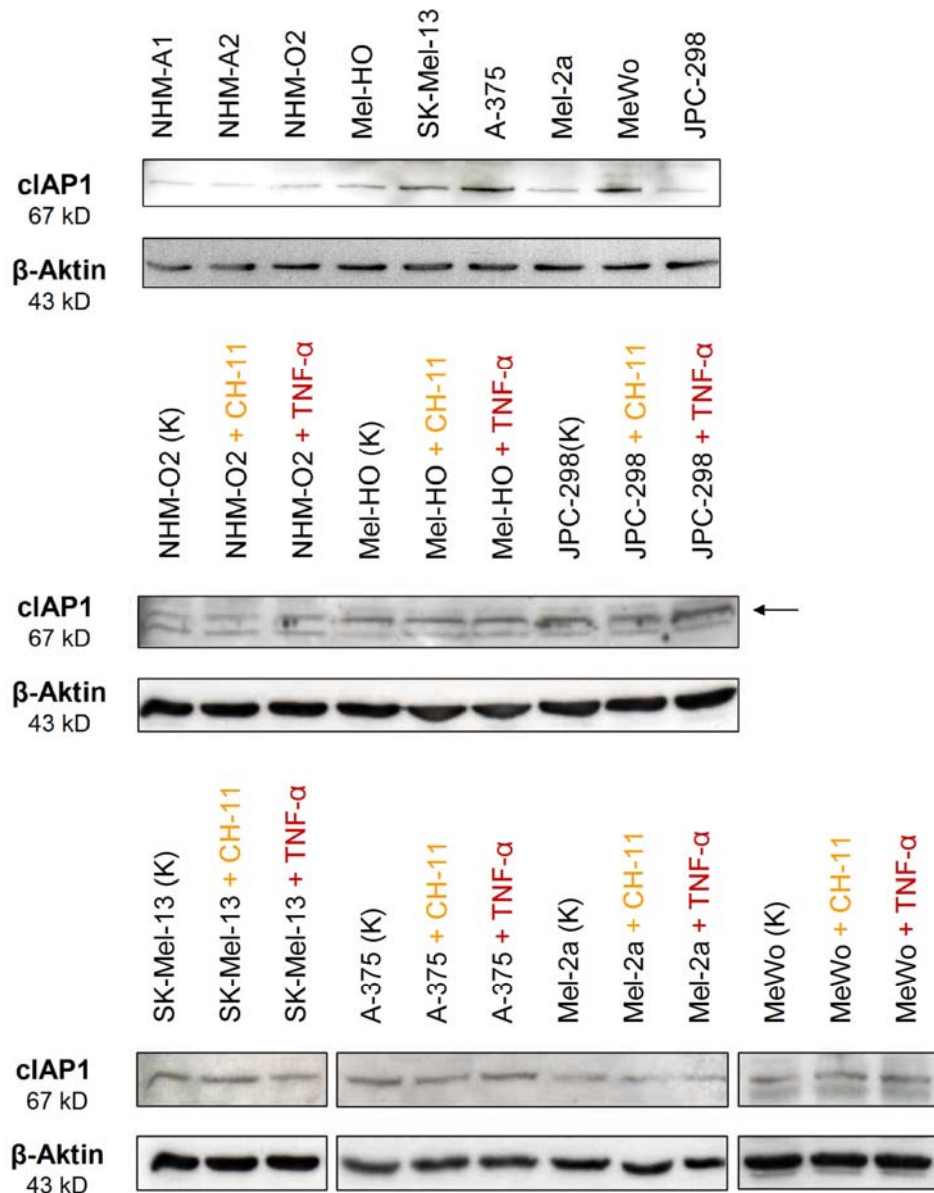


Abb. 3.8: Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien. Western-Blot-Analyse von cIAP1 in 3 Melanozyten- und sechs Melanomzelllinien sowie nach deren Behandlung mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Der cIAP1-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g/ml wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. Der kleine Pfeil markiert die entsprechende Proteinbande.

3.2.3 Erhöhte cIAP2-Expression in Melanomzelllinien

Die Expression von cIAP2 war in Melanomzelllinien ($2 \pm 0,6$; $p=0,03$) im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten hoch reguliert ($1 \pm 0,4$), wobei diese sowohl in den einzelnen NHM als auch Melanomzelllinien geringfügig differierte (siehe Abb. 3.9). Auch hier konnte nach der Stimulation mit CH-11 und TNF- α keine Expressionsveränderung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.10).

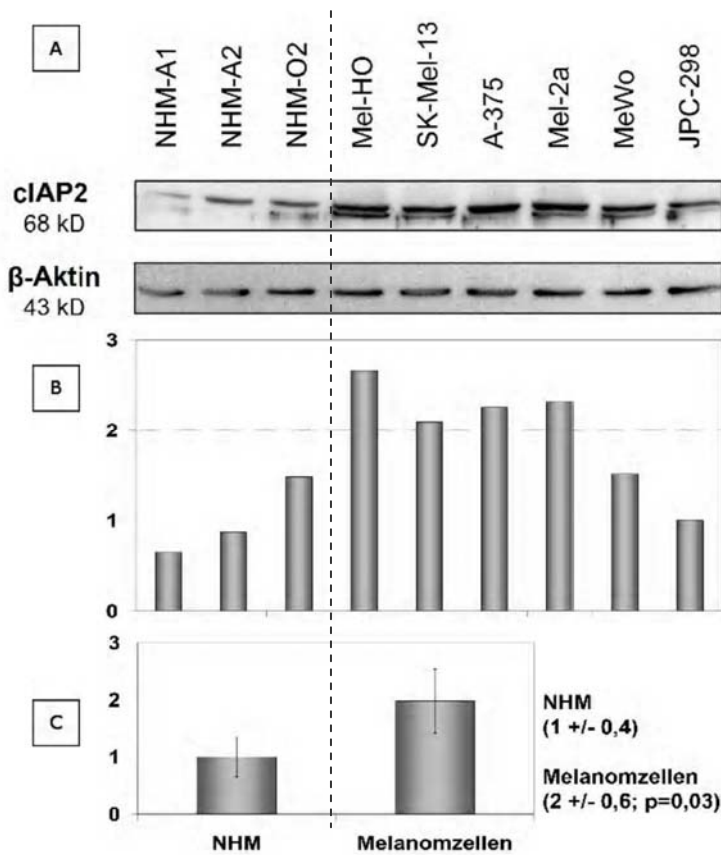


Abb. 3.9: Erhöhte cIAP2-Expression in Melanomzelllinien. **A:** Western-Blot-Analyse von cIAP2 in drei Melanozyten- und sechs Melanomzelllinien. Der cIAP2-Antikörper mit einer Konzentration von 200 µg IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. **B:** Semiquantitative Analyse der illumineszierenden Signale der in A abgebildeten Western Blots mit Hilfe des TINA-Programms. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. **C:** Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von cIAP2 in Melanozyten und Melanomzellen. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. Die sagittal gestrichelte Linie dient der optischen Trennung von Melanozyten und Melanomzellen.

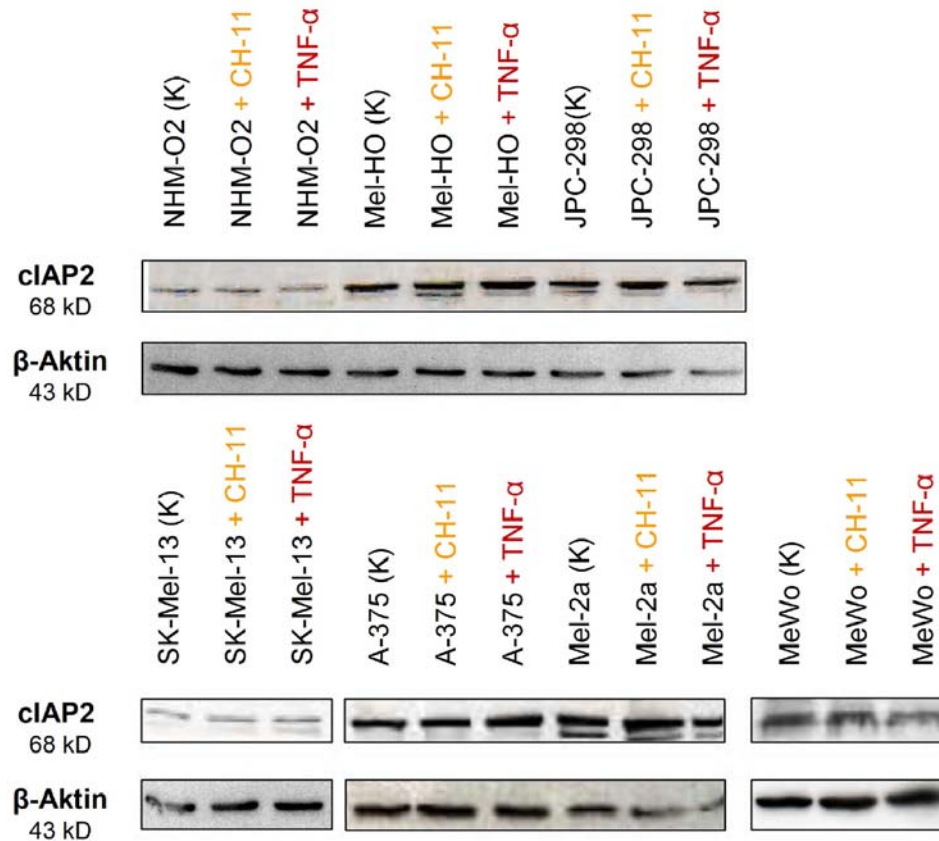


Abb. 3.10: Western-Blot-Analyse von cIAP2 nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der cIAP2-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g/ml wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.2.4 Erhöhte Expression von Survivin in Melanomzellen

Survivin ist für seine Expression in humanen Melanomzellen sowie seine nur schwache Expression in Melanozyten bekannt (Altieri, 2001; Bowen et al., 2003). So fand sich auch in dieser Untersuchung nur eine schwache Expression von Survivin in Melanozyten. Wesentlich stärker zeigte sich die Expression in den 6 untersuchten Melanomzelllinien. Im Mittel war die Expression in den Melanomzelllinien um den Faktor 8,9 (\pm 1,6; $p < 0,001$) höher als bei den Melanozyten (1 \pm 0,2) (siehe Abb. 3.11). Die stärkste Proteinexpression fand sich in den Zelllinien Mel-2a und MeWo. Eine etwas schwächere Expression fand sich in A-375, JPC-298 und SK-Mel-13. Die schwächste Expression wies die Zelllinie Mel-HO auf. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den CH-11-sensitiven (Mel-HO, SK-Mel-13, A-375)(4,9 \pm 1,6; $p < 0,03$) und den CH-11-resistenten (Mel-2a, MeWo, JPC-298)(8,4 \pm 1,5; $p < 0,002$) gefunden werden. Durch die Stimulation mit CH-11 und TNF- α konnte weder bei Melanozyten

noch bei Melanomzelllinien eine Veränderung der Expression von Survivin quantifiziert werden (siehe Abb. 3.12).

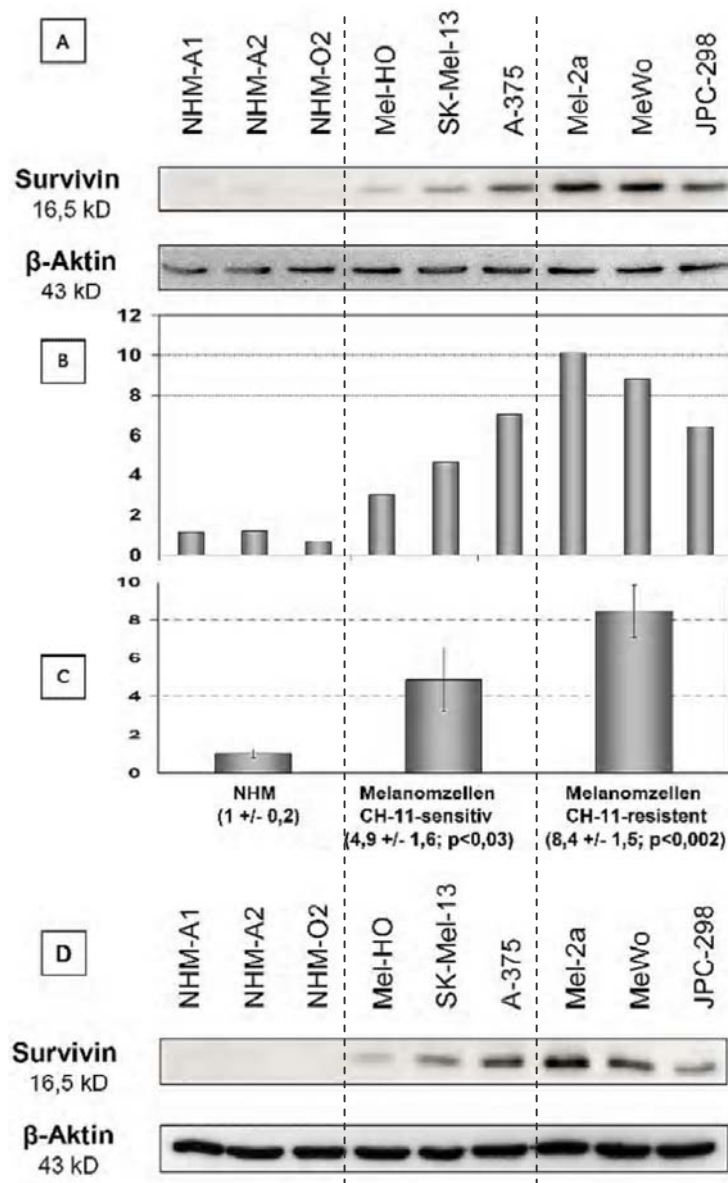


Abb. 3.11: Gesteigerte Survivin-Expression in Melanomzelllinien.

A: Western-Blot-Analyse von Survivin in drei Melanozyten- und sechs Melanomzelllinien. Der Survivin-Antikörper mit einer Konzentration von 200 µg IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. Reproduziertes Ergebnis siehe bei D. **B:** Semiquantitative Analyse der illumineszierenden Signale der in A abgebildeten Western Blots mit Hilfe des TINA-Programms. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. **C:** Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von Survivin in Melanozyten und Melanomzellen. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. **D:** Zweiter reproduzierter Blot der Western-Blot-Analyse von Survivin in drei Melanozytenlinien und sechs Melanomzelllinien.

Die sagittal gestrichelten Linien dienen der optischen Trennung von Melanozyten CH-11-sensitiven und -resistenten Melanomzellen.

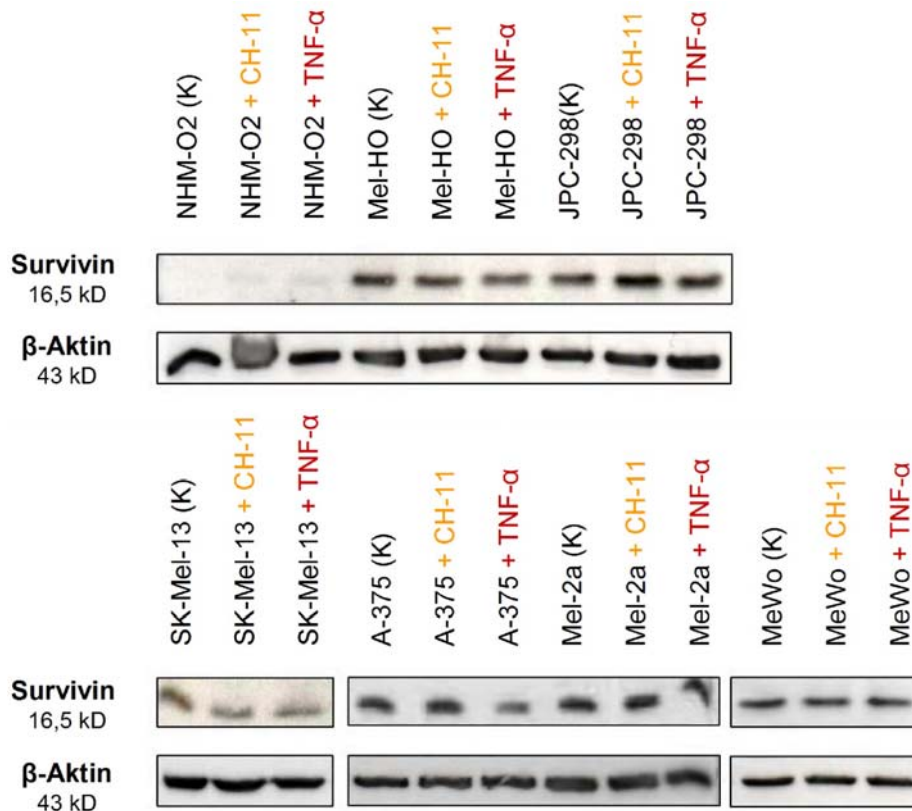


Abb. 3.12: Western-Blot-Analyse von Survivin nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der Survivin-Antikörper mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.2.5 Livin-Expression nur in einigen Melanomzelllinien

In Melanozyten konnte keine Expression von Livin gefunden werden. In den Melanomzellen fand sich nur in vier von sechs untersuchten Zelllinien eine Expression. Mel-2a und MeWo exprimierten Livin dabei stark. Mel-HO und SK-Mel-13 zeigten hingegen nur eine schwache Expression.

Nach Behandlung mit CH-11 und TNF- α zeigten sich bei Mel-2a keine Expressionsveränderungen von Livin. Bei der Melanomzelllinie MeWo fand sich nach Stimulation mit CH-11 eine Expressionssteigerung. Bei Mel-HO zeigte sich nach Behandlung mit CH-11 eine Spaltung des Proteins mit Doppelbande. Dieses wurde mehrmals reproduziert. Durch Behandlung mit TNF- α fand sich keine Veränderung der Livin-Expression (siehe Abb. 3.13).

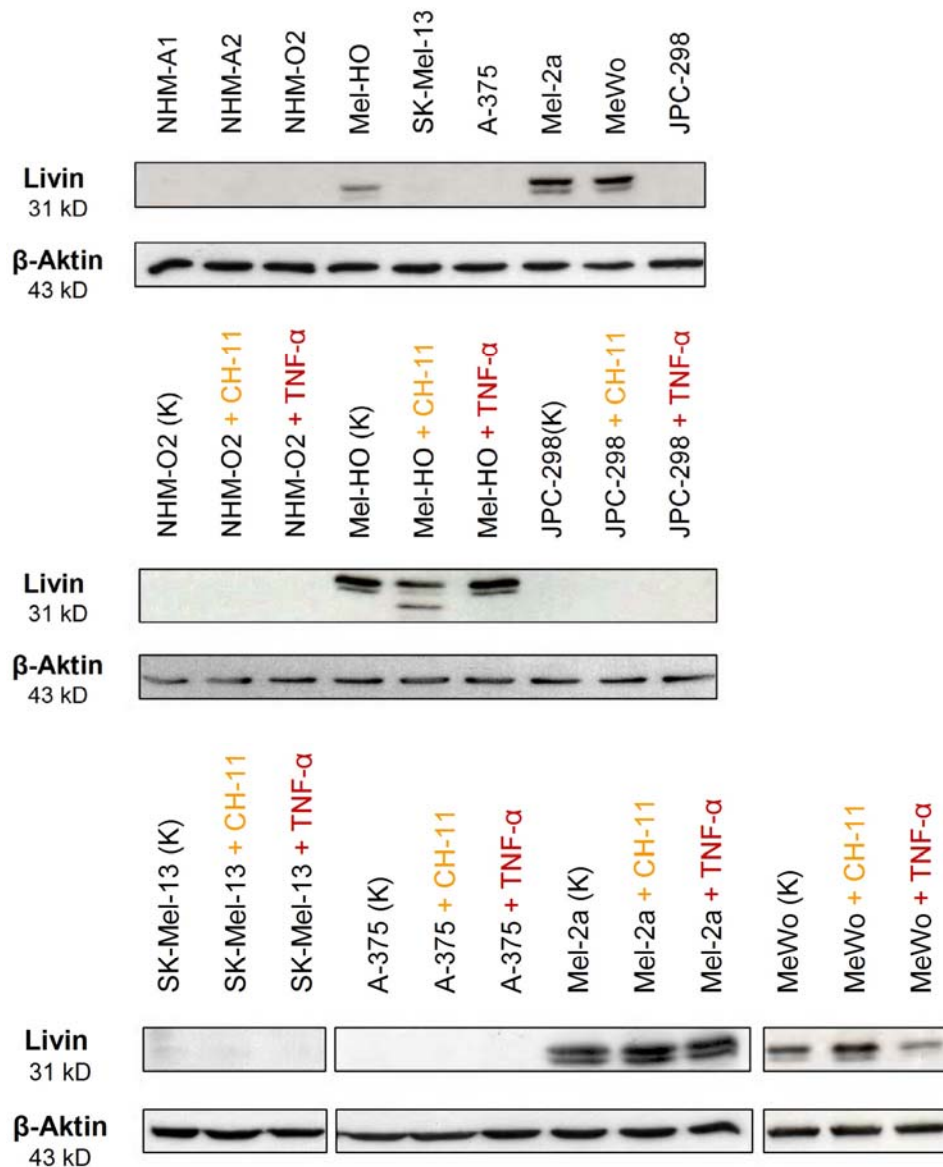


Abb. 3.13: Livin-Expression in einigen Melanomzelllinien. Western-Blot-Analyse von Livin nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der Livin-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:250, d.h. 1-2 μg /ml verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. Nach Stimulation mit CH-11 zeigt sich bei Mel-HO ein besonderes Spaltphänomen.

3.2.6 Keine FLIP-Expression in Melanozyten

Das antiapoptotische Protein FLIP konnte in der vorliegenden Arbeit in Melanozyten nicht nachgewiesen werden. In allen 6 untersuchten Melanomzellen zeigte sich jedoch eine FLIP-Expression. Es fanden sich große Unterschiede in der Expressionsstärke. In Mel-HO und Mel-2a wurde FLIP stark exprimiert, wohingegen sich in SK-Mel-13, A-375, MeWo und JPC-298 nur schwache Expressionen zeigten. Nach Behandlung mit CH-11

zeigte sich eine verstärkte FLIP-Expression. In allen weiteren Zelllinien konnten nach Behandlung mit CH-11 und TNF- α keine Expressionsveränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 3.14).

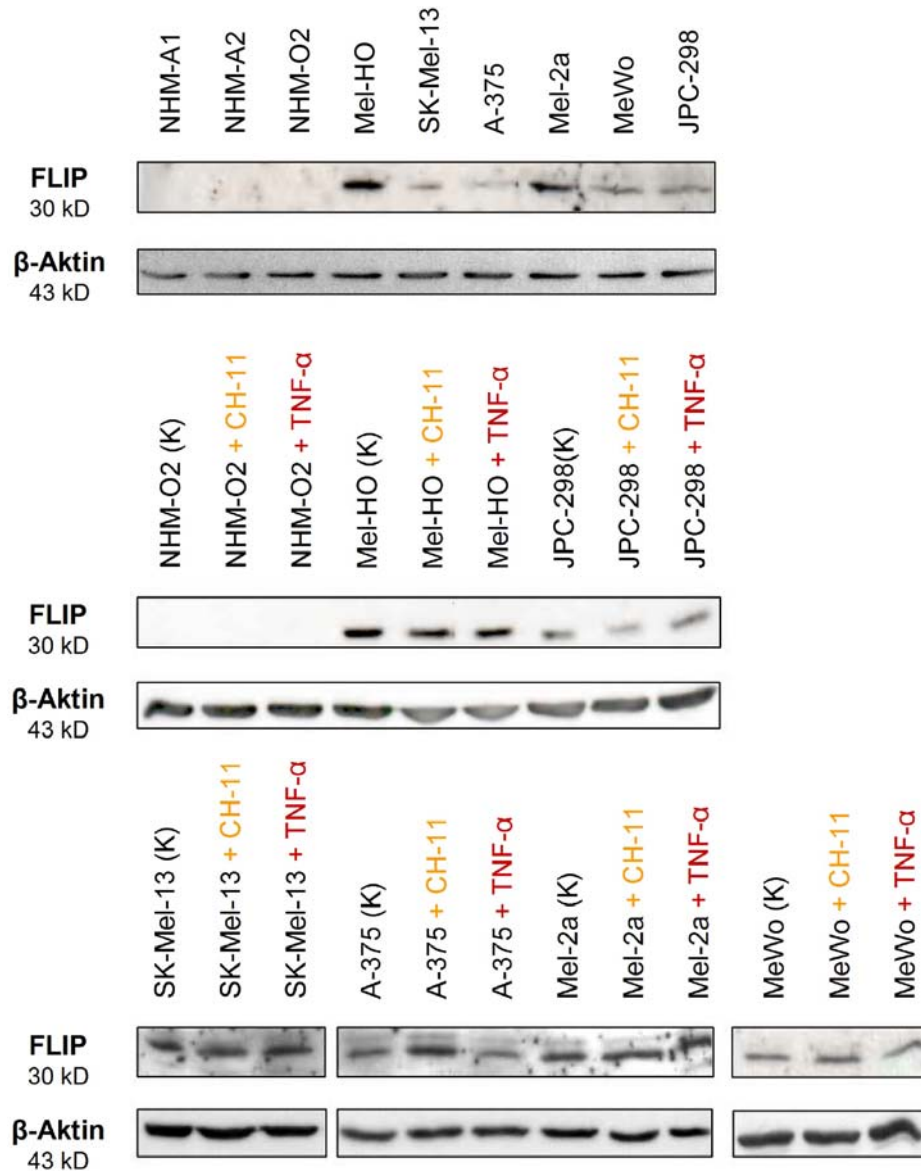


Abb. 3.14: Keine FLIP-Expression in Melanozyten. Western-Blot-Analyse von FLIP nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der FLIP-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.2.7 Expression von Smac in Melanozyten und Melanomzelllinien

Smac ist ein proapoptotisches mitochondriales Protein, das, wenn es aus den Mitochondrien freigesetzt wird, an IAP bindet und deren inhibitorische Wirkung auf Caspasen antagonisiert. Es war daher von großem Interesse die basale Expressionsrate von Smac in Melanozyten im Vergleich zu Melanomzelllinien zu untersuchen. Außerdem war von Interesse, ob die Behandlung mit CH-11 und TNF- α Expressionsveränderungen von Smac zur Folge hat.

Smac wurde sowohl in Melanozyten als auch Melanomzelllinien exprimiert, wobei die Expression in den Melanomzelllinien jedoch etwas stärker war. Die Melanomzelllinien A-375, Mel-HO, SK-Mel-13 und JPC-298 zeigten die stärkste Expression, wohingegen die Smac-Expression in Mel-2a und MeWo vergleichbar mit der in Melanozyten war. Veränderungen der Smac-Expression ließen sich nach Behandlung mit CH-11 und TNF- α nicht nachweisen (siehe Abb. 3.15).

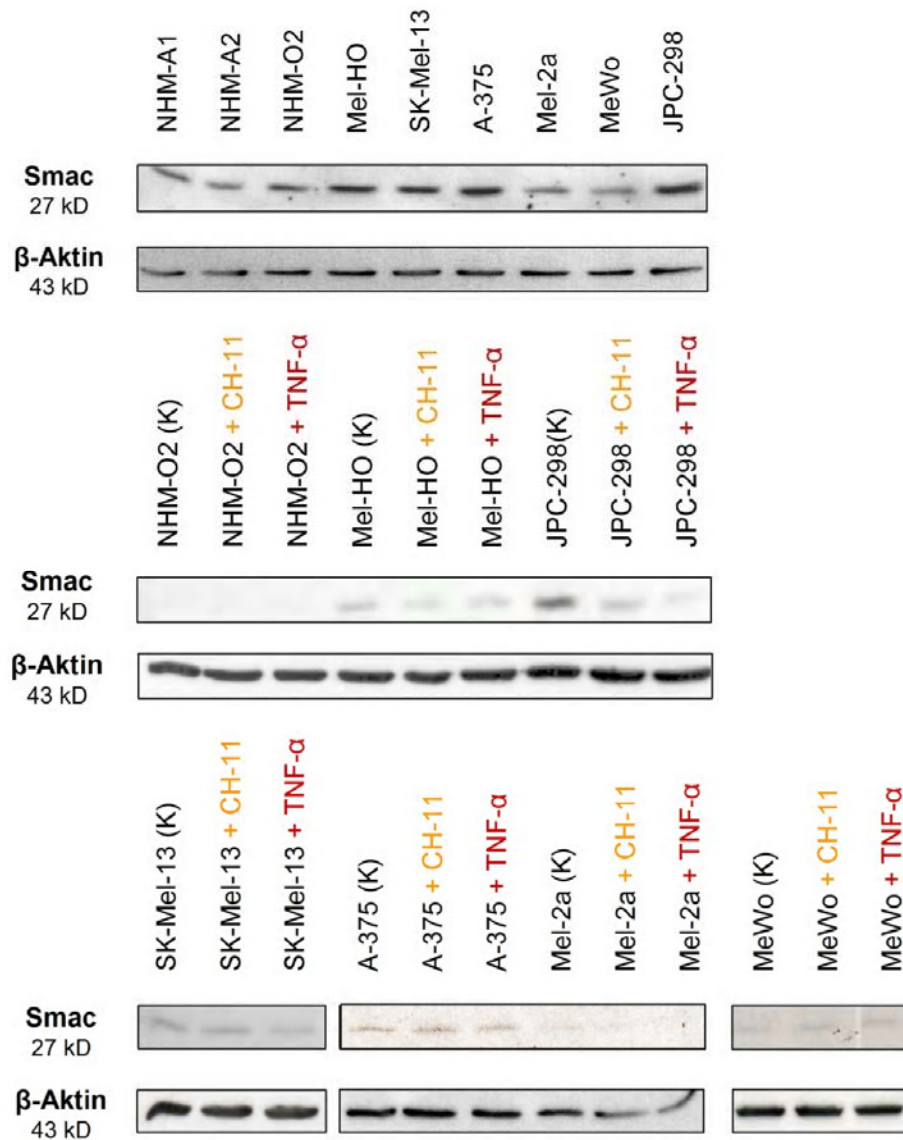


Abb. 3.15: Expression von Smac in Melanozyten und Melanomzelllinien. Western-Blot-Analyse von Smac nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der Smac-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μg IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen.

3.2.8 Reduzierte Expression von AIF in Melanomzellen

Das mitochondriale Intermembranprotein AIF kann bei Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien freigesetzt werden, in den Nukleus translozieren und dort die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung veranlassen.

AIF zeigte als einziges untersuchtes Protein eine stärkere Expression in Melanozyten (1 +/- 0,03) als in Melanomzellen (0,7 +/- 0,1; $p < 0,001$) (siehe Abb. 3.16).

Expressionsveränderungen fanden sich nach der Behandlung mit CH-11 und TNF- α nicht (siehe Abb. 3.17).

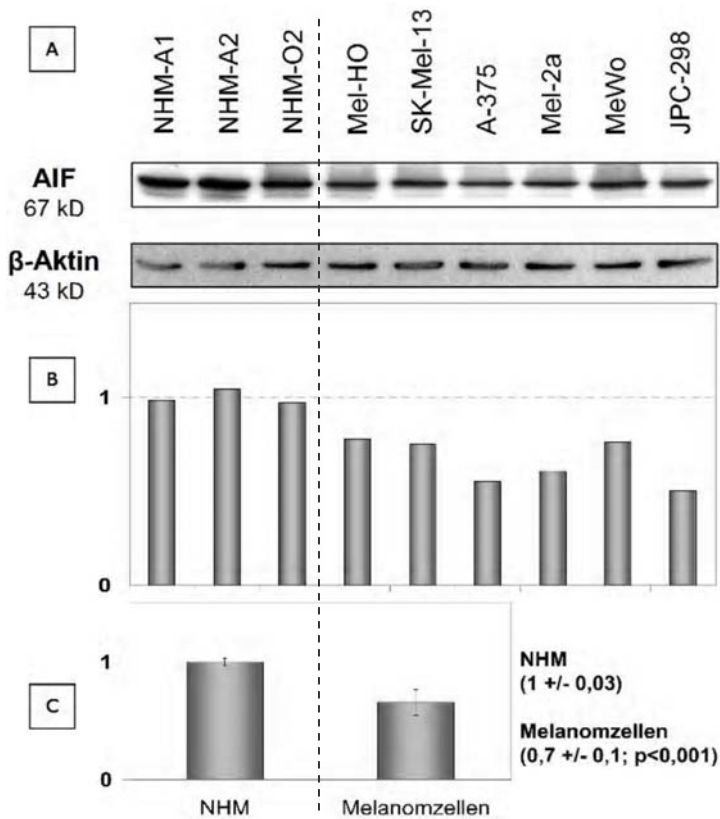


Abb. 3.16: geringere Expression von AIF in Melanomzelllinien als in Melanozyten. **A:** Western-Blot-Analyse von AIF in drei Melanozyten- und sechs Melanomzelllinien. Der AIF-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. **B:** Semiquantitative Analyse der illumineszierenden Signale der in A abgebildeten Western Blots mit Hilfe des TINA-Programms. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. **C:** Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von AIF in Melanozyten und Melanomzellen. Der Mittelwert von NHM wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. Die sagittale gestrichelte Linie dient der optischen Trennung von Melanozyten und Melanomzellen.

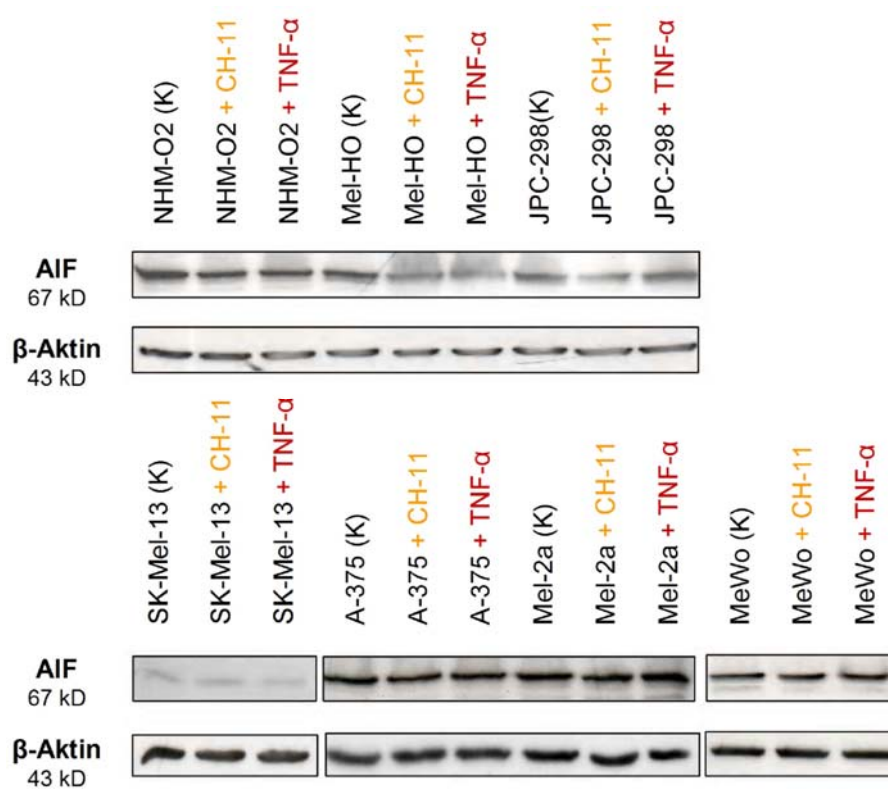


Abb. 3.17: Expression von AIF in Melanozyten und Melanomzelllinien. Western-Blot-Analyse von AIF nach Behandlung von Melanozyten und Melanomzelllinien mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der AIF-Antikörper mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen.

3.2.9 Gegenläufige Expression von AIF und Smac in den Melanomzelllinie MeWo und SK-Mel-13

Bei der Untersuchungen der Expression von AIF und Smac fanden sich in den Melanomzelllinien MeWo und SK-Mel-13 gegenläufige Expressionen. Bei MeWo zeigte sich eine stärkere Expression von AIF als in der Melanomzelllinie SK-Mel-13, wohingegen SK-Mel-13 eine stärkere Smac-Expression aufwies (siehe Abb. 3.18).

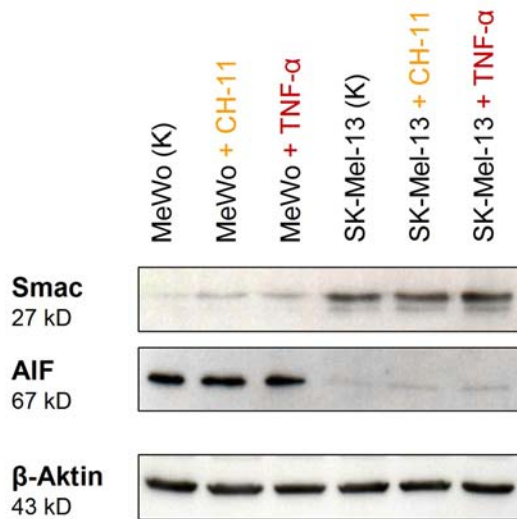


Abb. 3.18: gegenläufige AIF- und Smac-Expression in den Melanomzelllinien MeWo und SK-Mel-13. Western-Blot-Analyse der proapoptotischen Proteine Smac und AIF. Untersucht wurde jeweils eine unbehandelte Kontrolle (K) sowie Zellen nach der Behandlung mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen.

3.3 Expressionsanalyse von Regulatoren der Apoptose in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den stabilen Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L

Um die Auswirkungen von CD95L-Überexpression auf die Apoptoseregulation von Melanomzellen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die mit dem Gen für CD95-Ligand (CD95L) stabil transfizierte Melanomzelllinie SK-Mel-13 verwendet und auf die proapoptotischen Proteine AIF und Smac sowie die antiapoptotischen Proteine der IAP-Familie und FLIP untersucht.

3.3.1 Keine Veränderungen der Expression von XIAP und cIAP1

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Ausgangszellen SK-Mel-13 und den selektierten Klonen. Nach Stimulation mit CH-11 und TNF- α fanden sich keine Veränderungen der Expression von XIAP und cIAP1. Auch die Expression von CD95L, über den mit Doxycyclin stimulierten und aktivierten pTRE-Promotor, konnte keine Expressionsveränderung bewirken (siehe Abb. 3.19).

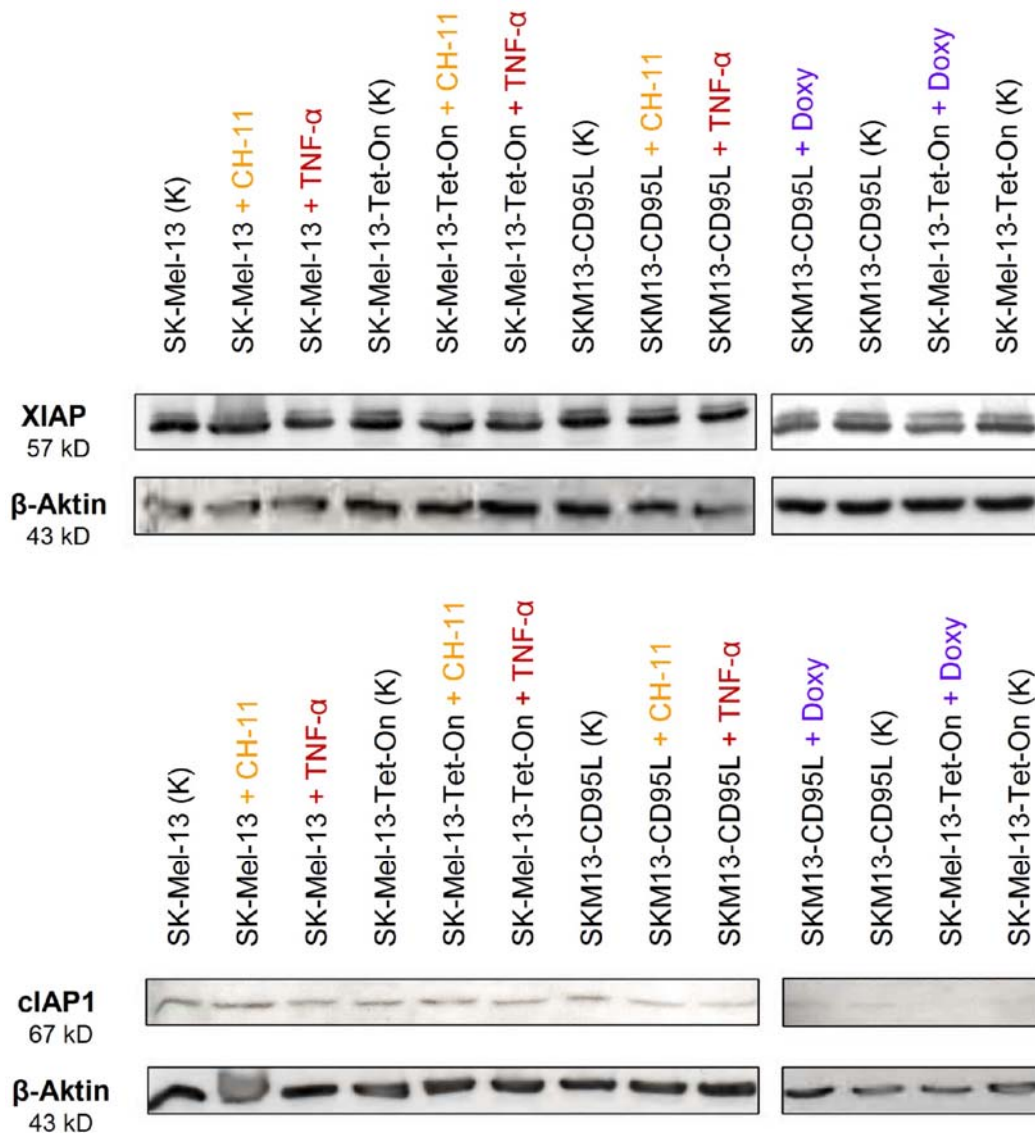


Abb. 3.19: Keine Veränderung der Expression von XIAP und cIAP1 in SK-Mel-13 und deren Transfektanten nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) oder Doxycyclin (blau). Western-Blot-Analyse für XIAP und cIAP1 in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und deren stabilen Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L. Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der XIAP-Antikörper (250 μ g/ml) wurde in einer Verdünnung von 1:250, der cIAP1-Antikörper (200 μ g/ml) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird je ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.3.2 Gesteigerte cIAP2-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten

Nach stabiler Transfektion der Melanomzelllinie SK-Mel-13 (1 +/- 0,1) wurde im entstandenen Klon SK-Mel-13-Tet-On eine Steigerung der cIAP2-Expression nachgewiesen (2,3 +/- 0,5; p=0,03). Eine weitere Erhöhung der Expression zeigte sich nach Transfektion mit pTRE-CD95L im Klon SKM13-CD95L (4,9 +/- 1,4; p=0,02).

Durch die Inkubation der beiden Transfektanten mit Doxycyclin waren keine Veränderungen festzustellen (siehe Abb. 3.20).

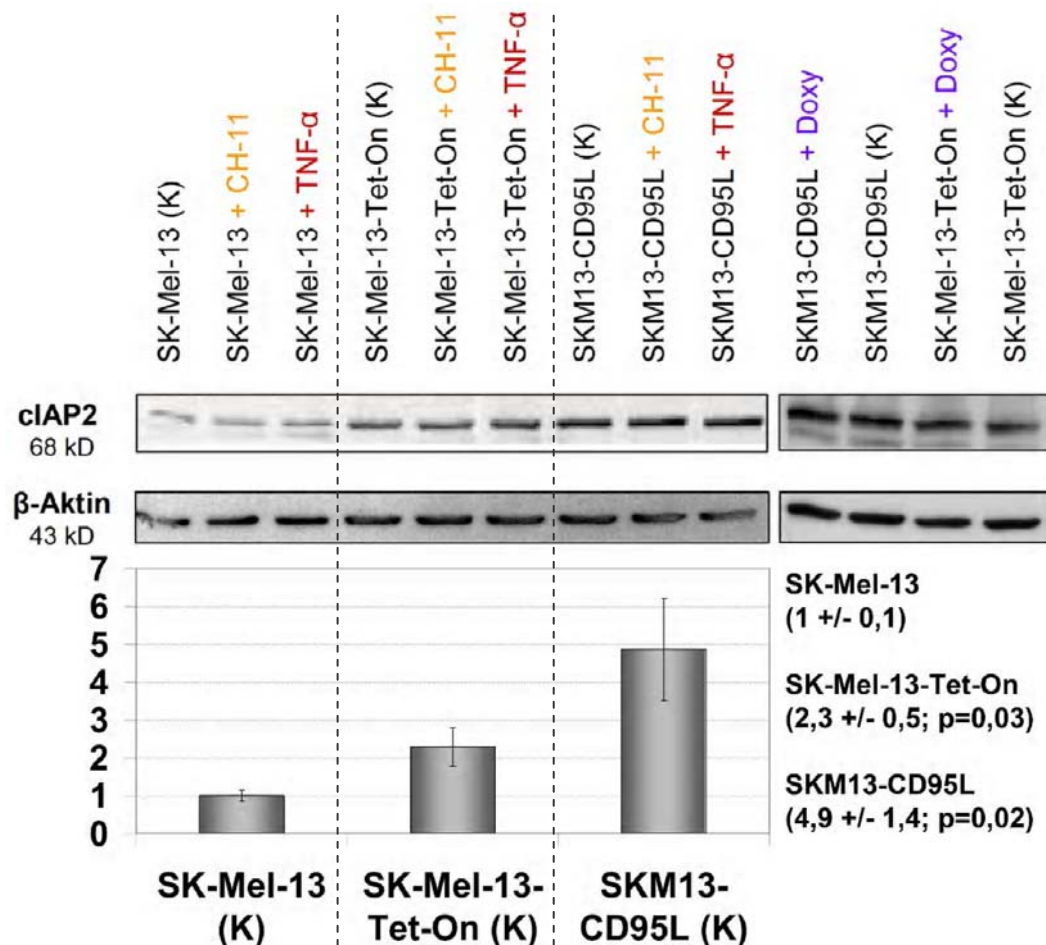


Abb. 3.20: Gesteigerte cIAP2-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten. *Oben:* Western-Blot-Analyse von cIAP2 in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) und Doxycyclin (blau). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der cIAP2-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g/ml wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird je ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. *Unten:* Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von cIAP2 in SK-Mel-13 und seinen Transfektanten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Der Mittelwert von SK-Mel-13 wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. Die sagittal gestrichelten Linien dienen der optischen Trennung der Zelllinien.

3.3.3 Gesteigerte Survivin-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten

In den stabil transfizierten Klonen SK-Mel-13-Tet-On (rel. Expressionsfaktor 4,26; SD 1,4) und SKM13-CD95 (rel. Expressionsfaktor 7,36; SD 1,33) war auch eine Steigerung der Survivin-Expression im Vergleich zur Ursprungszelllinie SK-Mel-13 zu verzeichnen.

Die Expressionsstärke von Survivin veränderte sich jedoch durch die Behandlung mit CH-11 und TNF- α in SK-Mel-13 und in den entsprechenden Zellklonen nicht mehr (siehe Abb 3.21).

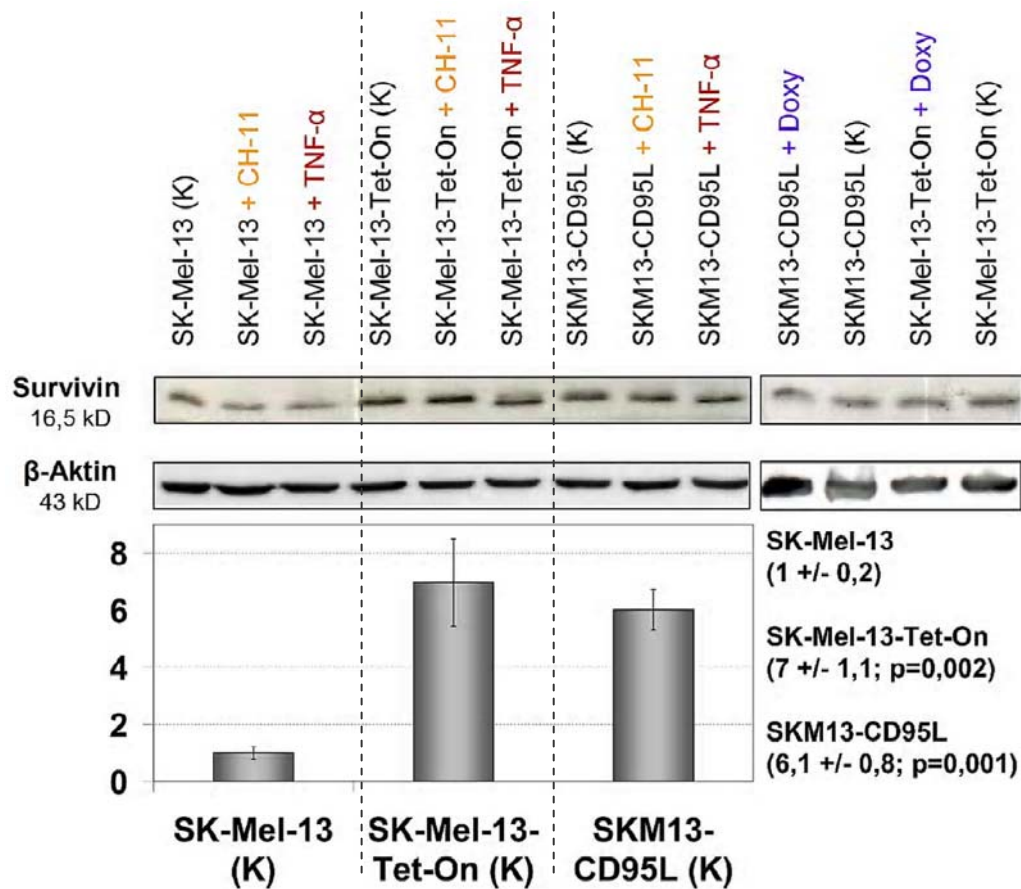


Abb. 3.21: Gesteigerte Survivin-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten. **Oben:** Western-Blot-Analyse von Survivin in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) und Doxycyclin (blau). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der Survivin-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird je ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet. **Unten:** Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von Survivin in SK-Mel-13 und seinen Transfektanten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Der Mittelwert von SK-Mel-13 wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. Die sagittal gestrichelten Linien dienen der optischen Trennung der Zelllinien.

3.3.4 Schwache Livin-Expression in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 sowie deren Transfektanten

SK-Mel-13, SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95 exprimierten Livin zu schwach um hier eine Unterscheidung der Expression beurteilen zu können (siehe Abb. 3.22).

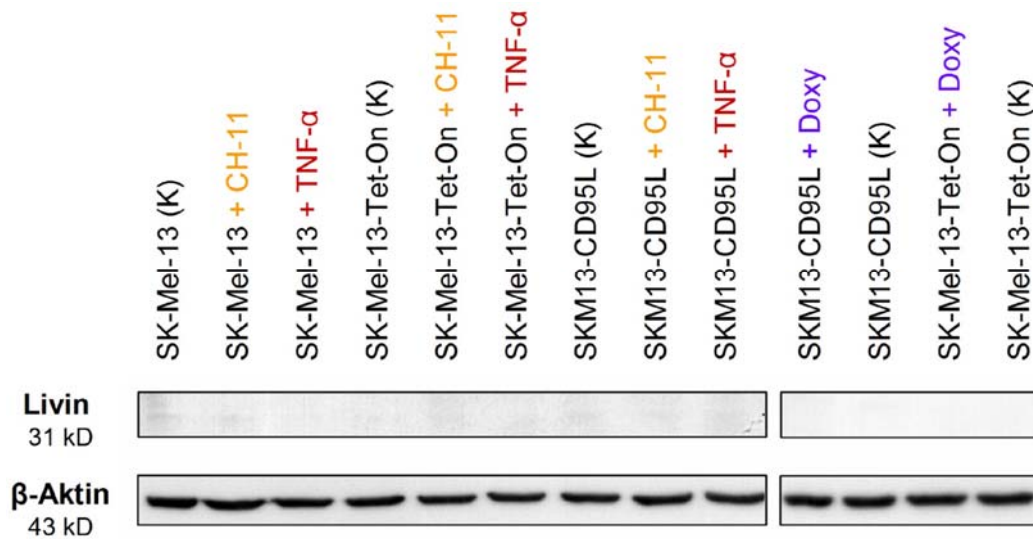


Abb. 3.221: Schwache Expression von Livin. Western-Blot-Analyse von Livin in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) und Doxycyclin (blau). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der Livin-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:250, d.h. 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.3.5 Verlust der FLIP-Expression in den SK-Mel-13-Transfektanten

Interessanterweise besaßen die Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95 im Gegensatz zur Ursprungszelle SK-Mel-13 nicht mehr die Fähigkeit FLIP zu exprimieren. Auch die Behandlung mit CH-11, TNF- α oder Doxycyclin führte zu keiner Re-Expression (siehe Abb. 3.23).

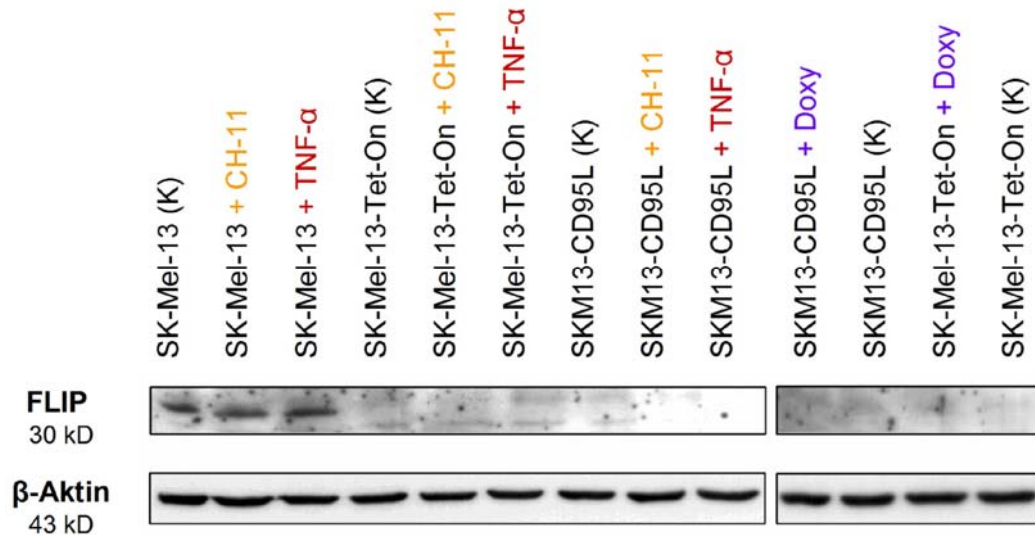


Abb. 3.23: Verlust der FLIP-Expression nach stabiler Transfektion. Western-Blot-Analyse für FLIP in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) und Doxycyclin (blau). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der FLIP-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Es wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen abgebildet.

3.3.6 Unveränderte Smac-Expression nach Transfektion und Behandlung mit CH-11, TNF- α und Doxycyclin

Bei der Ursprungszelle SK-Mel-13 sowie den transfizierten Zelllinien SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95 zeigte sich eine konstante Expression von Smac. Auch nach Behandlung mit CH-11, TNF- α oder Doxycyclin konnte keine Veränderung der Smac-Expression gefunden werden (siehe Abb. 3.24).

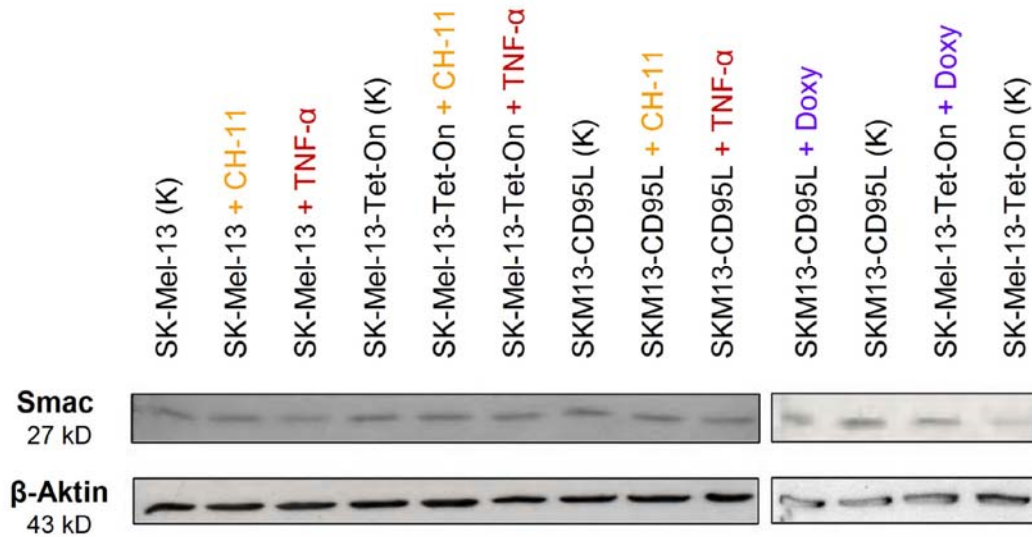


Abb. 3.24: Keine Veränderung der Smac-Expression nach Transfektion und Behandlung und Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF-α (rot) und Doxycyclin (blau). Western-Blot-Analyse von Smac in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L. Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der Smac-Antikörper mit einer Konzentration von 200 µg IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen.

3.3.7 Gesteigerte AIF-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten

Im Vergleich zur Melanomzelllinien SK-Mel-13 (1 +/- 0,2) zeigten die stabil transfizierten Zelllinien SK-Mel-13-Tet-On (1,6 +/- 0,2; p=0,05) und SKM13-CD95L (2 +/- 0,1; p=0,003) eine Zunahme der AIF-Expression. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen fanden sich nicht (siehe Abb. 3.25).

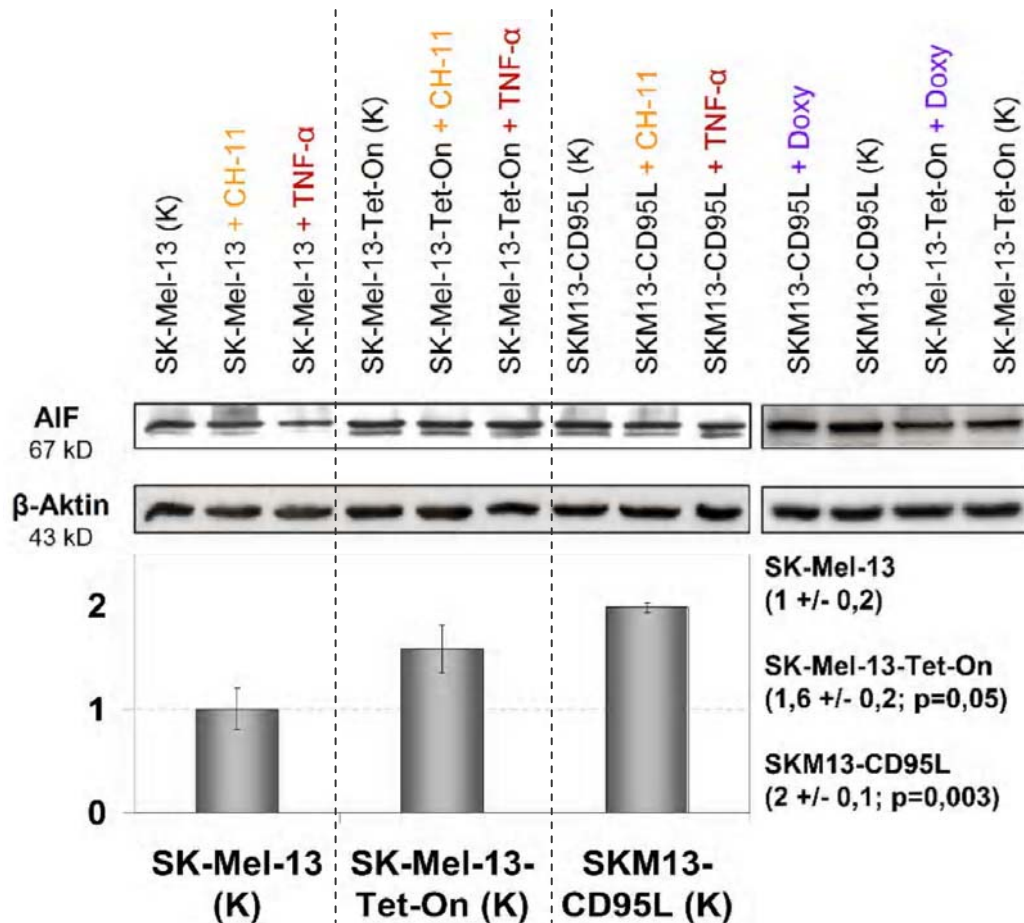


Abb. 3.25: Gesteigerte AIF-Expression bei SK-Mel-13-Transfektanten. *Oben:* Western-Blot-Analyse von AIF in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) und Doxycyclin (blau). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Der AIF-Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g IgG/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen. *Unten:* Graphik zur optischen Darstellung der Expressionsstärke von AIF in SK-Mel-13 und seinen Transfektanten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen. Der Mittelwert von SK-Mel-13 wurde dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Werte stammen aus der semiquantitativen Analyse der illumineszierenden Signale mit dem Programm TINA. Die sagittal gestrichelten Linien dienen der optischen Trennung der Zelllinien.

3.4 Metaanalyse der anti- und proapoptotischen Proteine in Melanozyten und Melanomzelllinien

3.4.1 Stärkere Expression proapoptotischer Proteine in Melanomzelllinien

Zu den Regulatoren der Apoptose zählen die antiapoptotischen Caspaseninhibitoren der Gruppe der IAP-Familie und FLIP sowie die proapoptotischen Proteine AIF und Smac. Um ein genaueres Bild der Bedeutung

für die Apoptose in humanen Melanomzellen zu bekommen, wurde ein Expressionsprofil dieser Proteine in Melanozyten und Melanomzelllinien erstellt.

Die untersuchten IAPs, FLIP sowie Smac zeigten in Melanomzelllinien eine stärkere Expression als in Melanozyten, wobei Livin nicht in allen Melanomzelllinien nachgewiesen werden konnte und cIAP1 nur eine geringe Expressionssteigerung in Melanomzellen zeigt. Demgegenüber war das proapoptotische AIF das einzige Protein, das in Melanomzellen eine schwächere Expression als in Melanozyten zeigte (siehe Abb. 3.26).

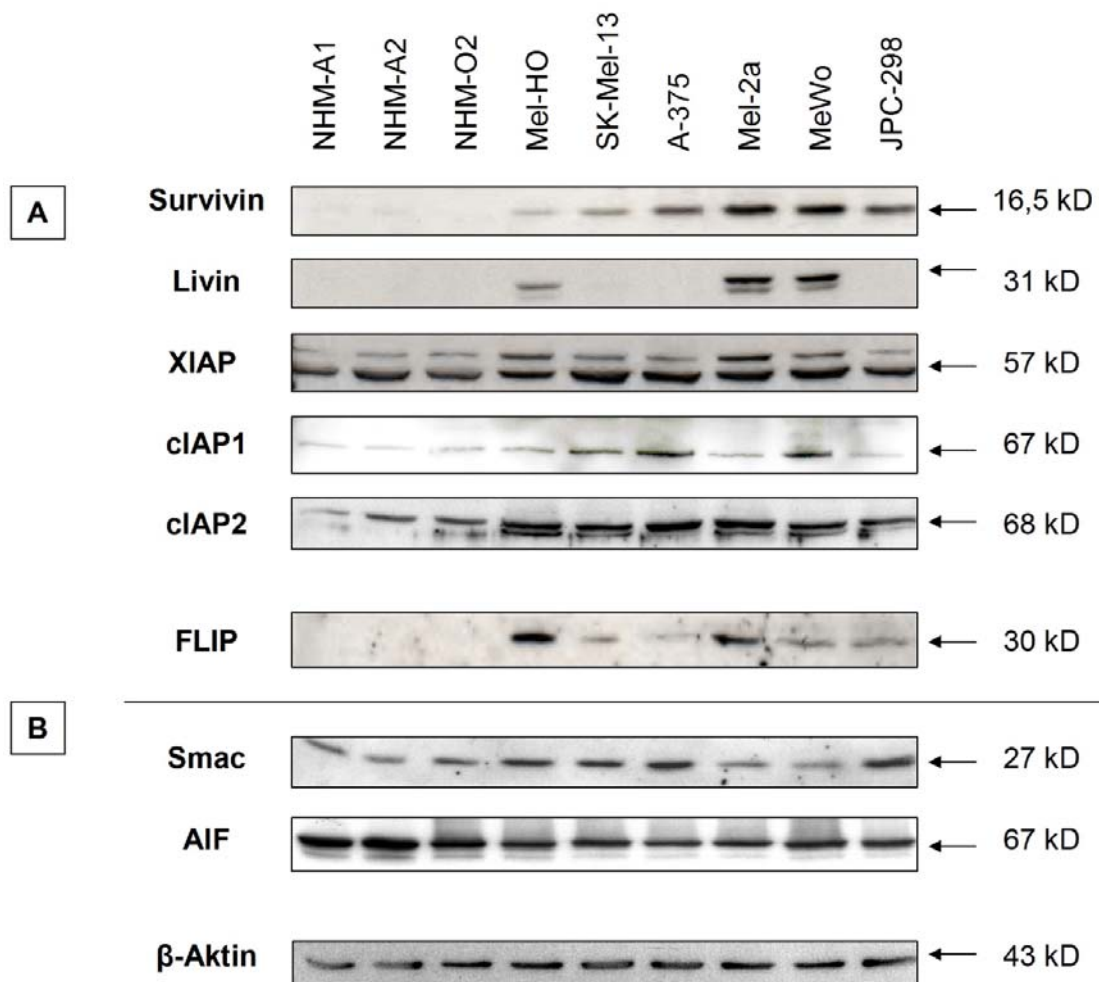


Abb. 3.26: Expressionsübersicht anti- und proapoptotischer Proteine in Melanozyten und Melanomzelllinien. Western-Blot-Analyse von (A) anti- und (B) proapoptotischen Proteinen. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen. Für weitere Erläuterungen wird auf die vorherigen Abbildungen verwiesen.

3.4.2 Gesteigerte Expression antiapoptotischer Proteine durch CH-11

In den untersuchten Melanozyten und Melanomzelllinien ließen sich nach der Behandlung mit TNF- α keine Expressionsveränderungen der untersuchten anti- und proapoptotischen Proteine nachweisen. Nach CH-11-Exposition reagierten bei der hiesigen Untersuchung zwei Melanomzelllinien (MeWo, A-375) mit gesteigerter Expression der antiapoptotischen Proteine Livin und FLIP. In der Zelllinie Mel-HO kam es zur Spaltung des Proteins Livin (siehe Abb. 3.27).

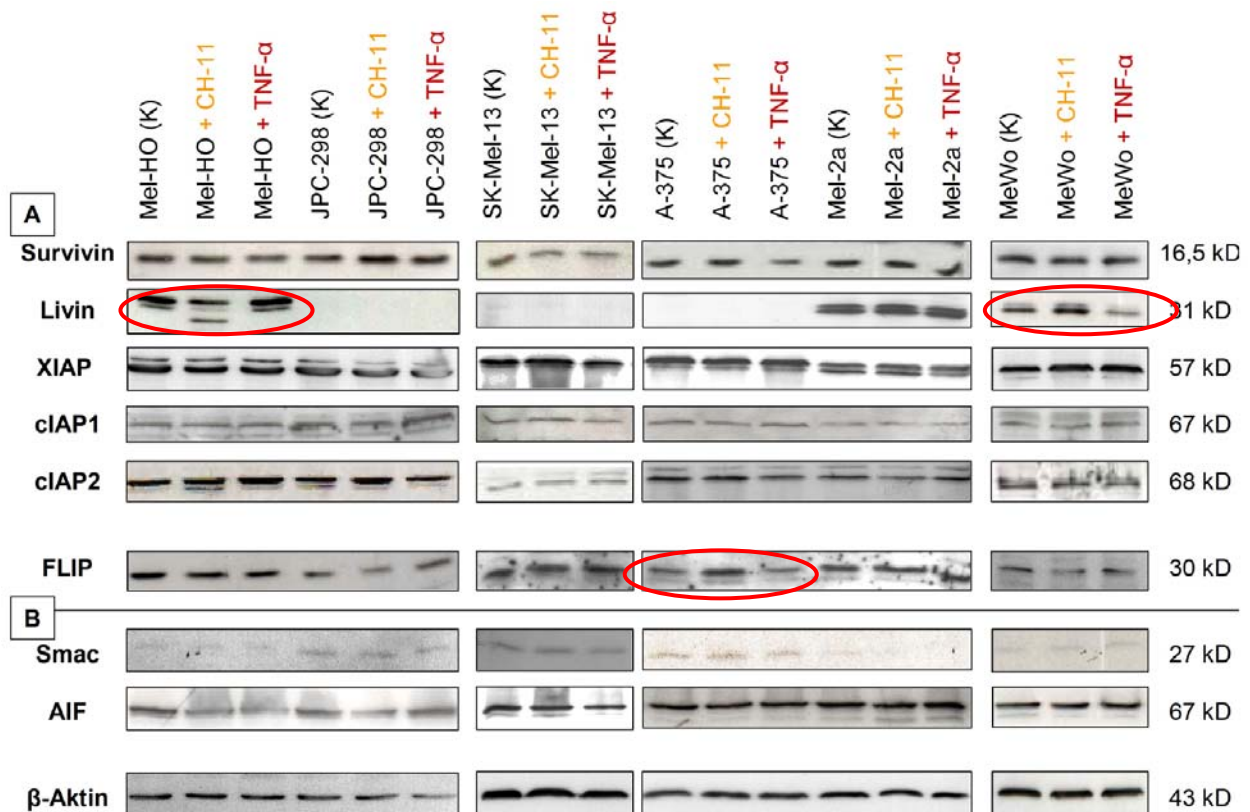


Abb. 3.27: Expressionsübersicht anti- und proapoptotischer Proteine nach Behandlung mit CH-11 und TNF- α in Melanomzelllinien. Western-Blot-Analyse von (A) anti- und (B) proapoptotischen Proteinen nach Behandlung der Melanomzellen mit CH-11 (gelb) und TNF- α (rot). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen. Rot markiert sind die Zelllinien, bei denen sich nach der Behandlung mit CH-11 eine Expressionsveränderung des untersuchten Proteins zeigte. Für weitere Erläuterungen wird auf die vorherigen Abbildungen verwiesen.

3.4.3 Veränderte Proteinexpression in SK-Mel-13-Transfektanten

Einhergehend mit den Transfektionen zeigten sich in der Melanomzelle SK-Mel-13 und ihren Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L eine Veränderung der Expression anti- und proapoptotischer Proteine. So fanden sich im Zuge der

Transfektionen CD95L resistenter Klone eine Steigerung der Expression der antiapoptotischen Proteine cIAP2 und Survivin sowie des proapoptotischen Proteins AIF. Die Veränderungen zwischen SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L sind jedoch nur gering. Insbesondere zeigte sich bei den SK-Mel-13-Transfektanten ein kompletter Verlust der FLIP-Expression. Die Behandlung mit CH-11 und TNF- α ergab keine weiteren Expressionsveränderungen (siehe Abb. 3.28).

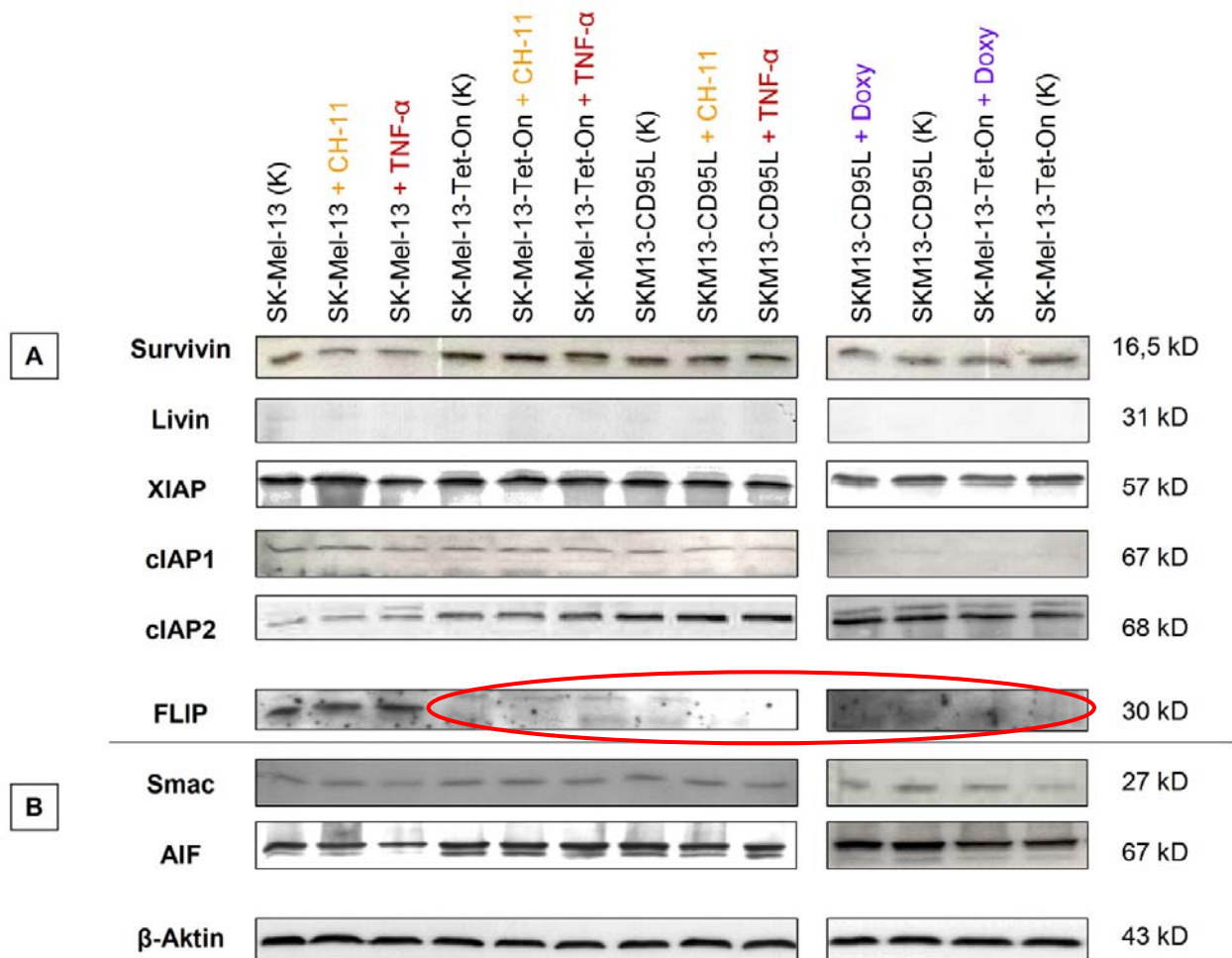


Abb. 3.28: Expressionsübersicht anti- und proapoptotischer Proteine in der Melanomzelllinie SK-Mel-13 und den stabilen Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L. Western-Blot-Analyse von (A) anti- und (B) proapoptotischen Proteinen nach Behandlung mit CH-11 (gelb), TNF- α (rot) und Doxycyclin (blau). Zum Vergleich wurden jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle (K) aufgetragen. Beta-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt wird jeweils ein repräsentativer Blot von 3 in gleicher Form reproduzierten Ergebnissen. Rot markiert sind die Zelllinien, bei denen sich ein kompletten FLIP-Verlust zeigte. Für weitere Erläuterungen wird auf die vorherigen Abbildungen verwiesen.

4 Diskussion

Antiapoptotische Faktoren stehen unter physiologischen Bedingungen mit proapoptotischen Gegenspielern im Gleichgewicht und sorgen damit für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase (Eberle et al., 2007). Eine Dysregulation dieses fein regulierten Mechanismus kann die Entstehung von hyperproliferierenden, malignen Erkrankungen wie auch von degenerativen oder autoimmunen Erkrankungen zur Folge haben (Vermeulen et al., 2005; Mahoney und Rosen, 2005).

Das Melanom der Haut ist als hoch maligner und weitgehend therapieresistenter Tumor bekannt (Garbe, 2005). Als eine der Hauptursachen für die Therapieresistenz des Melanoms gilt die Entwicklung einer Apoptosedefizienz (Eberle et al., 2008). Beim Transformationsvorgang zur malignen Melanomzelle kommt es zu Veränderungen im zellulären Kontext, die das Überleben der Zelle gewährleisten. Für neue Therapieansätze ist daher die Aufklärung der Apoptosesignalwege von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits die Wirksamkeit Apoptose-induzierender Stimuli auf Melanozyten und Melanomzellen quantifiziert und andererseits deren Einfluss auf die Expression von Apoptoseregulatoren in Melanozyten und Melanomzellen untersucht und verglichen. Zur Stimulation der Apoptose wurden die Induktoren des Rezeptor-vermittelten Apoptosesignalweges CH-11 und TNF- α sowie das körpereigene Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) ausgewählt, die bereits in vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Steigerung der Apoptose eingesetzt wurden (Raisova et al., 2000; Fecker et al., 2002).

Es wurde deutlich, dass die untersuchten Melanomzelllinien im Gegensatz zu Melanozyten zum Teil Resistenzen gegenüber der Apoptoseinduktion zeigten. So ließen sich auf die Stimulation der Apoptose mit CH-11 und TNF- α in den Melanomzelllinien Mel-2a und MeWo, auf TNF- α auch in Bro, Resistenzen finden. In der Melanomzelllinie Mel-2a konnte nach Stimulation mit CH-11 auch eine signifikante Abnahme der Zytotoxizität nachgewiesen werden. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten vergleichbare Ergebnisse gezeigt werden. So waren auch hier die Melanomzelllinien MeWo und Mel-2a auf die Behandlung mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 resistent und A375,

Mel-HO und SK-Mel-13 sensitiv (Raisova et al., 2000; 2001). Die Stimulation mit der Kombination aus IFN- γ , LPS und TNF- α lieferte in allen Melanomzelllinien einen starken apoptotischen Impuls. In der Einzelanwendung zeigt IFN- γ in allen Melanomzelllinien apoptotische Wirkung, wohingegen LPS in keiner Zelllinie Apoptose auslöst.

Dass IFN- γ einen Apoptose-steigernden Effekt hat, konnte bereits 1999 an Endothelzellen gezeigt werden. Durch die zusätzliche Gabe von TNF- α , nicht aber LPS, konnte damals die apoptotische Wirkung von IFN- γ gesteigert werden. Wobei TNF- α oder LPS alleine keine Apoptose induzierte (Wang et al., 1999). In embryonalen Hepatozyten hingegen wurde die apoptotische Wirkung von IFN- γ sowohl durch die additive Gabe von TNF- α als auch durch LPS potenziert (So et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass IFN- γ , LPS und TNF- α in Kombination auch in Melanomzellen eine Steigerung der Apoptose zur Folge hat (Fecker et al., 2002). Untersuchungen der apoptotischen Wirkung der einzelnen Stimulanzen wurde nicht vorgenommen.

Um die Auswirkungen der CD95L-Überexpression auf die Apoptoseregulation von Melanomzellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die mit dem Gen für CD95L stabil transgenierte Zelllinie SK-Mel-13 verwendet.

Über die Wirksamkeit der Apoptose-induzierenden Stimuli auf die Expression von Apoptoseregulatoren und deren Bedeutung für die Apoptose kann für Melanomzellen keine allumfassende Aussage getroffen werden. Anhand der Untersuchungsergebnisse können jedoch beispielhafte Strukturmodelle erstellt werden, die zur Entwicklung neuer Gedankenansätze beitragen und Grundlage weiterer Forschungsarbeiten sein können.

4.1 Die Bedeutung von FLIP für die Apoptosesensitivität in Melanomzellen

Eine besondere Rolle bei der Übermittlung der Überlebenssignale spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, wobei auch die Initiatorcaspasen die Sensitivität der Melanomzellen zu kontrollieren scheinen (Rayet und G elinas, 1999; Barkett und Gilmore, 1999; Kurbanov et al., 2007).

FLIP ist ein kompetitiver Hemmer der Initiatorcaspasen. Es hemmt die Bindung von Procaspase-8 und -10 an den DISC und verhindert somit deren Aktivierung (Scaffidi et

al., 1999; Yang et al., 2007). Weiterhin kann FLIP durch die Aktivierung von NF- κ B das proliferative Signal von CD95 verstärken (Kataoka et al., 2000; Golks et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass hohe FLIP-Level in Malignomen zur Inhibierung der Apoptose führen (Zong et al., 2009). Wird die FLIP-Expression hingegen z.B. mittels Cisplatin, siRNA oder Lentiviren gehemmt, kommt es zur Sensitivierung gegenüber der CH-11- oder TRAIL-induzierten Apoptose und somit zur gesteigerten Apoptoserate (Yang et al., 2007; Chawla-Sarkar et al., 2004; Braun et al., 2009). In Leukämie- und Brustkrebszellen wurde durch Taxol, in malignen Gliomzellen durch Genistein, eine Reduktion der FLIP-Expression erreicht und die Zellen für apoptotische Impulse sensitiviert (Day et al., 2006; Siegelin et al., 2009).

Parallelen zeigten sich auch in dieser Arbeit beim malignen Melanom. FLIP ließ sich, entgegen den vorherigen Studienergebnissen, nur in Melanomzellen finden, nicht jedoch in Melanozyten. In vorherigen Untersuchungen konnte FLIP einerseits sowohl in Melanozyten als auch in Melanomzellen und andererseits weder in Melanomen noch in normalen humanen Melanozyten gefunden werden (Irmeler et al., 1997; Bowen et al., 2003). Bei fehlender FLIP-Expression zeigten sich die Melanozyten sensitiv auf die Stimulation der Apoptose mit CH-11 und TNF- α . Ebenso verhielt es sich mit den nur schwach FLIP-exprimierenden Melanomzelllinien A-375 und SK-Mel-13, auch diese zeigten sich sensitiv auf die Apoptosestimulation.

Eine Erklärung für die Apoptosesensitivität von Mel-HO trotz verhältnismäßig starker FLIP-Expression ist möglicherweise in den Isoformen von FLIP zu finden. Auf mRNA-Level sind 11 Isoformen von FLIP beschrieben, auf Proteinebene nur 3 Isoformen nachgewiesen: FLIP_L, FLIP_S und FLIP_R (Irmeler et al., 1997; Scaffidi et al., 1999; Golks et al., 2005). In dieser Arbeit wurde ein Antikörper verwendet der sowohl FLIP_L als auch FLIP_S detektiert. FLIP_L und FLIP_S sind beide in der Lage vor der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose zu schützen, FLIP_L ist jedoch nicht nur ein Inhibitor der Apoptose, sondern kann durch Heterodimerisierung auch als Aktivator der Procaspasen-8 und -10 auftreten (Boatright et al., 2003; Micheau et al., 2002). Das apoptotische Verhalten von Mel-HO könnte möglicherweise durch eine verstärkte FLIP_L-Expression erklärt werden. Es könnte daher von therapeutischer Bedeutung sein, die genauen Verhältnisse der einzelnen FLIP-Varianten in malignen Melanomzellen zu klären und offen zu legen, ob es eine einheitliche Struktur dieser Proteine gibt, für die ein therapeutisches Konzept erarbeitet werden kann.

Eine interessante Beobachtung konnte bei den Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien gemacht werden, die eine CD95L-Überexpression induzieren. Als Ursprungszelllinie diente SK-Mel-13, die FLIP schwach exprimierte und sich auf Apoptosestimuli sensitiv zeigte. In den Transfektanten SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L konnte FLIP dann nicht mehr nachgewiesen werden. Nach einmaliger Transfektion zeigte sich eine Sensitivität auf die Apoptosestimulation mit CH-11 und TNF- α , die nach erneuter Transfektion verloren ging. Durch die Aktivierung des Tet-On-System durch Doxycyclin und die Initiierung der Expression des Gens für den CD95-Liganden, zeigte sich wieder apoptotisches Verhalten. Die Hemmung der Apoptose trotz Fehlen von FLIP lässt einen weiteren noch nicht bekannten wichtigen Parameter vermuten. FLIP scheint daher nicht immer entscheidend für die Apoptoseinhibierung zu sein.

4.2 Hohe Livin-Expression in Mel-2a und MeWo korreliert mit niedriger Smac-Expression

Livin wird neben embryonalen Geweben nur in malignen Tumoren exprimiert und kommt in gesunden Geweben nicht vor (Vucic et al., 2000; Kasof und Gomes, 2001). Es kann die Caspasen-3, -7 und -9 binden und inhibieren, wobei aber davon ausgegangen wird, dass Livin die Apoptose eher durch Smac-Bindung und Inhibierung seiner proapoptotischen Wirkung hemmt, als durch die direkte Inhibierung der Caspasen (Vucic et al., 2000; 2005).

Interessanterweise zeichnete sich in der vorliegenden Arbeit in Melanomzelllinien eine gegenläufige Expression von Livin und Smac ab. In den Melanomzelllinien mit starker Livin-Expression (Mel-2a und MeWo) fand sich nur eine schwache Smac-Expression, während bei fehlender Livin-Expression eine stärkere Smac-Expression vorgefunden werden konnte. Dies scheint einen Einfluss von Livin auf die Smac-Expression widerzuspiegeln. Eine Veränderung der mitochondrialen Smac-Bildung scheint nicht wahrscheinlich. Es ist eher daran zu denken, dass Livin an Smac bindet und zur Degradation des Proteins führt, so dass es nicht mehr oder nur noch schwach detektiert werden kann und seine proapoptotischen Fähigkeiten verliert. Fehlt Livin, kann Smac ungehindert agieren und proapoptotisch wirken. Unterstützt wird diese Annahme durch

die Apoptosesensitivität der Melanomzelllinien A375 und SK-Mel-13 sowie der Melanozyten, in denen Livin nicht oder nur gering exprimiert wird.

Diese Befunde stehen im Einklang mit den bisherigen Studien, die einerseits bei fehlender Livin-Expression eine Steigerung der Apoptoserate und im Gegensatz dazu bei gesteigerter Livin-Expression eine Chemotherapieresistenz nachwiesen (Ashhab et al., 2001; Nachmias et al., 2003). Es wurden daher bereits therapeutische Strategien zur Inhibierung von Livin diskutiert (Chang und Schimmer, 2007). Bei der akuten lymphatischen Leukämie dient Livin bereits als therapeutischer Marker (Choi et al., 2007).

Anders verhielt es sich bei den Untersuchungsbefunden der Zelllinie Mel-HO, die ebenfalls zu der Gruppe der auf apoptotische Stimuli sensitiven Melanomzelllinien gehört. Hier fand sich sowohl eine Livin als auch eine Smac-Expression, so dass das gerade diskutierte Modell nicht bei allen Zelllinien übergreifend angewendet werden kann. Eine Begründung für die Apoptosesensitivität trotz starker Livin-Expression könnte in den Isoformen von Livin (Livin α und Livin β) gefunden werden, die unterschiedliche Expressionen und differierende antiapoptotische Eigenschaften zu haben scheinen (Ashhab et al., 2001). Es sind daher noch weitere Untersuchungen notwendig, um die genauen Verhältnisse zu ergründen.

4.3 AIF-Antagonismus von Survivin könnte Ursache einer reduzierten AIF-Expression in Melanomzellen sein

Entgegen bisherigen Studien, in denen Survivin nur in fetalen und einigen stark proliferativen Geweben zu finden war, konnte Survivin, wenn auch nur sehr schwach, in der vorliegenden Arbeit auch in kultivierten Melanozyten gefunden werden (Ambrosini et al., 1997; Gianani et al., 2001). In den untersuchten kultivierten Melanomzelllinien fand sich eine weitaus stärkere (ca. 9-fach stärkere) Expression. AIF hingegen zeigte in Melanomzelllinien eine schwächere Expression als in Melanozyten. Diese Expressionsunterschiede könnten Ausdruck des AIF-Antagonismus von Survivin sein.

Survivin bindet die aktiven Caspasen-3, -7 und -9 (Tamm et al., 1998). Außerdem spielt es eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung (Li et al., 1998). Als weitere antiapoptotische Funktion von Survivin wurde der AIF-Antagonismus beschrieben, der den Caspasen-unabhängigen Signalweg unterbindet (Liu et al., 2004).

Mehrere Untersuchungen unterstützen das Model, dass AIF durch die Aktivierung von PARP-1 (*nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1*) aus den Mitochondrien in den Nukleus transloziert wird und dort sowohl eine Chromatinkondensation als auch DNA-Fragmentierung induziert (Yu et al., 2002) (siehe Abb. 1.6). PARP-1 schützt das Genom durch seine regulierende Funktion bei der DNA-Reparatur, -Transkription und -Replikation (Hong et al., 2004). PARP-1 wird durch DNA-Brüche aktiviert. Obwohl die Aktivierung von PARP-1 durch milde genotoxische Stimuli die DNA-Reparatur und das Überleben der Zelle ermöglicht, fördern irreparable DNA-Schäden die Apoptose und Nekrose. Die frühe PARP-Aktivierung scheint bei der Apoptose die Caspasen-Kaskade zu unterstützen, neben der Vermittlung der Translokation von AIF vom Mitochondrium in den Nukleus z.B. durch die Stabilisierung von p53 und Inhibierung der schnellen Aktivierung von DNAsen (Yu et al., 2002). Durch den AIF-Antagonismus von Survivin wird dieser Apoptose-unterstützende Mechanismus blockiert und die apoptotische Resistenz verstärkt. Ob die Interaktion zwischen diesen beiden Molekülen direkt oder indirekt ist, ist nicht klar (Ye et al., 2002). AIF scheint jedoch in seiner Proteinstruktur durch Survivin abgebaut zu werden, so dass dieses in seiner ursprünglichen Form nicht mehr detektiert werden kann. Die proapoptotischen Fähigkeiten gehen verloren, die Apoptoseresistenz entsteht.

Die Aufklärung der Funktion von Survivin und AIF beim Ablauf des apoptotischen Prozesses könnte von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung Apoptose-basierter Therapien sein; entweder zur Förderung der Apoptose zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen oder zum Schutz vor apoptotischen Prozessen bei degenerativen Erkrankungen.

Survivin hat als spezifischer Tumormarker beim malignen Melanom und anderen malignen Veränderungen der Haut bereits prognostische und therapeutische Bedeutung. In der Tat konnte in retrospektiven Analysen gezeigt werden, dass eine Survivin-Überexpression in bestimmten Malignomen, wie z.B. Endometrium-, Mamma-, Nierenzell-, Ovarial-, Bronchial- und Ösophaguskarzinomen, mit einem verkürzten Gesamtüberleben der betroffenen Patienten assoziiert ist (Ai et al., 2006; Vegran et al., 2005; Byunn et al., 2007; Linguang et al., 2007; Lu et al., 2004; Kato et al., 2001). Eine Überexpression von Survivin könnte für die erhöhte Therapieresistenz bestimmter Tumoren verantwortlich sein. Die Expression korreliert in den meisten Tumoren mit

einer schlechteren Prognose, so dass es als Biomarker zur Diagnose, Progression und Therapieerfolg in verschiedenen Tumorarten benutzt werden kann.

Bei den Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L konnte in dieser Arbeit im Gegensatz zur Ursprungszelllinie SK-Mel-13 sowohl eine Steigerung der Survivin- als auch der AIF-Expression gefunden werden, so dass hier noch andere Mechanismen eine Rolle zu spielen scheinen.

4.4 Negative Korrelation zwischen Survivin- und Smac-Expression

Survivin ist sowohl im Nukleus als auch im Zytosol lokalisiert (Ambrosini et al., 1997). Neben der Hemmung der Caspasenaktivierung und dem AIF-Antagonismus spielt Survivin durch die Interaktion mit der Zellzyklus-regulierenden Kinase Cdk4 eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung (Tamm et al., 1998; Liu et al., 2004; Li et al., 1998).

Weiterhin konnte eine negative Korrelation zwischen der Survivin- und Smac-Expression gefunden werden. Bei einem signifikanten Abfall der Smac-Expression konnte im hepatozellulären Karzinom eine gesteigerte Aktivität von Survivin beobachtet werden, die zur reduzierten Apoptose und zum Tumorwachstum führt (Bao et al., 2006). Wird die Interaktion zwischen Survivin und Smac z.B. durch Survivin-Mutanten gehemmt, kann die Strahlen-induzierte Apoptose von Tumorzellen gesteigert werden (Ogura et al., 2008).

Smac ist ein mitochondriales Protein, das nach der Freisetzung aus den Mitochondrien durch Bindung der IAPs deren Caspasen-inhibierende Wirkung antagonisieren und so zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade führen kann (Deveraux und Reed, 1999; Duckett, 2005). Smac und die Caspasen konkurrieren dabei um dieselben Bindungsstellen der IAPs. Die Überexpression von Smac fördert die Apoptose.

Aufgrund ihrer IAP-regulierenden Fähigkeiten, wurden die Peptide von Smac und seinen Isoformen bereits in der experimentellen Tumorthherapie als potentielle Wirkstoffe erprobt (Bockbrader et al., 2005; Petrucci et al., 2007; Chauhan et al., 2007). So konnten z.B. die Zellen des Mamma-Karzinoms durch die Überexpression von Smac für die TRAIL- und Chemotherapeutika-induzierte Apoptose sensitiviert werden (Fandy et al., 2008).

Mit den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten die beschriebenen Beobachtungen bestätigt werden. In Melanozyten ließen sich mittels Westernblot-Analyse sowohl eine Smac- als auch eine schwache Survivin-Expression nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte in allen untersuchten Melanomzelllinien Survivin in höheren Konzentrationen als in Melanozyten detektiert werden, wobei hier zwischen den CH-11-sensitiven und CH-11-resistenten Melanomzellen unterschieden werden konnte. In den als CH-11-resistent geltenden Zelllinien Mel-2a, MeWo und JPC-298 fand sich eine etwas stärkere Survivin-Expression als in den übrigen Melanomzellen. Bei der Untersuchung der Smac-Expression verhielt es sich entgegengesetzt. Hier ließ sich in den CH-11-sensitiven Zelllinien Mel-HO, SK-Mel-13 und A-375 eine stärkere Expression als in den übrigen Zellen finden.

Möglicherweise liegt die CH-11-Resistenz in den Expressionsunterschieden von Survivin und Smac bzw. in der hohen Survivin-Expression begründet. Dass Survivin bei der Resistenzentwicklung eine größere Rolle als Smac spielen könnte, lassen die Expressionsverhältnisse dieser beiden Proteine in der Melanomzelllinie JPC-298 vermuten. Die als CH-11-resistent eingestufte Zelllinie zeigte eine ähnlich starke Smac-Expression wie die CH-11-sensitiven Melanomzelllinien und somit eine deutlich stärkere Expression als die übrigen als CH-11-resistent gewerteten Melanomzelllinien dieser Arbeit. Die Survivin-Expression hingegen zeigt im Gegensatz zu den anderen CH-11-resistenten Zellen keine großen Unterschiede. Die Expressionsvarianz von Smac scheint daher keinen großen Einfluss auf das apoptotische Verhalten der Melanomzellen zu haben.

Eine weitere Begründung für die Resistenzentwicklung könnte die Interaktion von Survivin mit XIAP sein, die XIAP in seiner antiapoptotischen Funktion unterstützt und Smac mit seinen inhibierenden Fähigkeiten fern hält. Durch die Interaktion wird die Stabilität von XIAP gefördert und die Caspase-9 synergistisch gehemmt (Yan et al., 2004; Dohi et al., 2004). XIAP ist einer der potentesten Caspasen-Inhibitoren der Mitglieder der IAP-Familie. Es lag in dieser Arbeit in den Melanomzelllinien stärker exprimiert vor als in den Melanozyten.

4.5 Gleichförmig verminderte AIF-Expression korreliert nicht mit der Todesliganden-Sensitivität von Melanomzellen

Nach einem apoptotischen Stimulus werden durch eine mitochondriale Permeabilitätsänderung proapoptotische Proteine freigesetzt, zu denen auch Smac und AIF zählen. AIF führt sowohl zur Chromatinkondensation als auch zur DNA-Fragmentierung. Smac hingegen kann IAPs binden und inaktivieren und so deren Caspasen-inhibierende Wirkung antagonisieren (Vaux und Silke, 2003).

Interessanterweise fand sich bei den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit eine scheinbar gegenläufige Expression von AIF und Smac in Melanozyten und Melanomzelllinien. AIF wird in Melanomzellen schwächer und Smac stärker als in Melanozyten exprimiert. Bei den Melanomzelllinien (bei MeWo und SK-Mel-13) (siehe Abb. 3.18) fiel ebenfalls eine gegenläufige Expression auf. Bei der gegenüber den Apoptose-stimulierenden Faktoren CH-11 und TNF- α resistenten Melanomzelllinie MeWo lag im Gegensatz zur sensitiven SK-Mel-13-Zelllinie eine schwache Smac- und starke AIF-Expression vor. SK-Mel-13 wies eine starke Smac- und schwache AIF-Expression auf.

Die Expression des einen proapoptotischen Proteins könnte die Expression des anderen indirekt beeinflussen. Hinweise für eine direkte Korrelation lassen sich in der bislang vorliegenden Literatur nicht finden. AIF und Smac werden nach apoptotischem Stimulus gemeinsam nebst anderen Makromolekülen aus dem Mitochondrium freigesetzt, scheinen aber nicht miteinander zu interagieren.

Wie in Kapitel 4.2 diskutiert, könnte die schwache bzw. starke Smac-Expression durch die Präsenz bzw. das Fehlen von Livin erklärt werden, welches Smac bindet und inhibiert. In Kapitel 4.4 wurde eine weitere Hypothese dargelegt, in der, durch die Interaktionen zwischen Smac und Survivin, der Abfall der Smac-Expression vermutet wird. Die Expressionunterschiede von Smac und Survivin in CH-11-sensitiven und -resistenten Melanomzelllinien könnten weiterhin eine Erklärung für die Veränderung der Todesliganden-Sensitivität sein.

Auch auf die AIF-Expression scheint Survivin einen modulierenden Einfluss zu haben. Survivin scheint, wie in Kapitel 4.3 diskutiert, durch antagonistische Fähigkeiten die AIF-Expression zu regulieren. Für andere IAPs sind keine AIF-regulierenden Eigenschaften beschrieben. In der vorliegenden Arbeit kommt es in Melanomzelllinien im Vergleich zu

Melanozyten neben einer gesteigerten Survivin-Expression zu einer gleichförmig verminderten AIF-Expression. Da sich keine Unterschiede der AIF-Expression zwischen CH-11-sensitiven und -resistenten Melanomzellen finden ließen, scheint AIF für die Resistenzentwicklung von Melanomzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.6 Expressionsveränderungen pro- und antiapoptotischer Proteine in stabil mit CD95L transfizierten Zellklonen

Der CD95-Ligand (CD95L) bindet und aktiviert den CD95-Rezeptor, wodurch in der Regel Apoptose induziert wird. CD95L wird hauptsächlich auf Lymphozyten, immunprivilegiertem Gewebe, wie z.B. Auge, Ovar, Plazenta oder Hoden, sowie konstitutiv in verschiedenen Tumoren exprimiert (Suda et al., 1995; Griffith et al., 1995; Hahne et al., 1996). Viele Tumoren sind resistent gegenüber CD95L, auch wenn sie CD95 auf der Zelloberfläche exprimieren.

Bei der Resistenzentwicklung spielen viele Faktoren eine Rolle. Neben NF- κ B haben pro- und antiapoptotische Proteine wie Bcl-2-Proteine sowie die IAPs einen entscheidenden Einfluss. So ist das Bax/Bcl-2-Verhältnis (Bax/Bcl-2-Ratio) entscheidend für die Empfindlichkeit der CD95-vermittelten Apoptose. Eine niedrige Bax/Bcl-2-Ratio ist charakterisierend für resistente Melanomzellen, eine hohe Bax/Bcl-2-Ratio für sensitive Zellen (Raisova et al., 2001). NF- κ B kann abhängig vom Stimulus und vom zellulären Kontext sowohl proapoptotische Gene, wie CD95, CD95L, als auch antiapoptotische Gene, wie IAPs, Bcl-xL, aktivieren (Ahn et al., 2001).

Ein anderer Mechanismus der Apoptoseresistenz ist die Expression von löslichen Rezeptoren (z.B. sCD95; cR3, TR6), die CD95L binden und kompetitiv inhibieren können (Midis et al., 1996; Yu et al., 1999).

Ziel der aktuellen Forschung ist es, die Rolle von CD95L in Melanomzellen zu ergründen und die Möglichkeiten des CD95-Signalweges für therapeutische Zwecke zu explorieren. Um die Expressionsveränderungen weiterer pro- und antiapoptotischer Proteine bei CD95L-Überexpression zu untersuchen, wurde eine mit dem Gen für CD95-Ligand (CD95L) stabil transfizierte CH-11-sensitive Melanomzelllinie verwendet. Die Zelllinie SK-Mel-13 wurde zunächst mit dem Tet-On-Plasmid (SK-Mel-Tet-On) und

anschließend mit dem Plasmid pTRE-CD95L, das das Gen für den CD95-Liganden kodiert, transfiziert (SKM13-CD95L).

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von CD95L verstärkt Apoptose induziert und hierdurch eine Tumorbildung und Progression verhindert und die Remission bereits etablierter Tumore erreicht werden kann (Eberle et al., 2003).

Auch in dieser Arbeit wurde deutlich, dass das apoptotische Verhalten nach stabiler Transfektion und Induktion der CD95L-Genexpression mit Doxycyclin deutlich anstieg. Die zweifach transfizierte Zelllinie SKM13-CD95L zeigte sich jedoch vor Aktivierung mit Doxycyclin auf die Induktion der Apoptose resistent. Einhergehend mit den Transfektionen kommt es in den Melanomzellen SK-Mel-13, SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L zu Veränderungen der anti- und proapoptotischen Proteine. So fand sich in SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L eine Steigerung der Proteinexpression von cIAP2 und Survivin. Bei den proapoptotischen Proteinen zeigte sich nur eine gesteigerte Expression von AIF. Zwischen SK-Mel-13-Tet-On und SKM13-CD95L waren kaum Unterschiede der Proteinexpressionen zu finden. Weiterhin zeigten die SK-Mel-13-Transfektanten ein Verlust der FLIP-Expression (siehe Abb. 3.28). Die anschließende Aktivierung des CD95L-Promotors mit Doxycyclin führte zu keiner weiteren Expressionsveränderung dieser Proteine.

Die Apoptoseresistenz der zweifach transfizierten Melanomzelllinie SKM13-CD95L scheint unabhängig von den Expressionsveränderungen der pro- und antiapoptotischen Proteine zu sein. Es könnte sich hierbei um ein Resistenzmodell durch „leaky“-Expression von CD95L handeln. Die Zellen wurden stabil transfiziert und überlebende Zellen weiter kultiviert. Durch einen „undichten“ Promotor kann es auch ohne Doxycyclin zu einer geringen Expression von CD95L kommen. Die überlebenden Zellen könnten somit auf Resistenz gegenüber dem selbst produzierten CD95L selektiert worden sein. Forschungsergebnisse anderer Untersucher haben gezeigt, dass selbst durch minimale Aktivität eines Promotors eine Basalexpression des Transgens nachweisbar war („Leaky System“) (Rendahl et al., 1998; Mano et al., 2000; Mizuguchi und Hayakawa, 2001).

Kubanov et al. konnte, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, für die TRAIL-Resistenzentwicklung weder ein Korrelat in der Expressionssteigerung antiapoptotischer Proteine noch in der gesteigerten NF- κ B-Aktivität finden.

Charakteristisch für die TRAIL-Resistenz schien die signifikante Downregulation der Caspase-8, -10 und DR4 zu sein (Kurbanov et al., 2007). Es wäre interessant, ob die Downregulation der Caspasen bei resistenten Melanomzelllinien ubiquitär eine Rolle spielt.

4.7 CH-11 führt zur gesteigerten Expression und Spaltung antiapoptotischer Proteine

In einer vorangegangenen Arbeit konnte durch die Stimulation mit TNF- α in malignen pleuralen Mesotheliomzellen neben der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B zum Nukleus ein Anstieg der IAP-Expressionlevel (IAP1, IAP2 und XIAP) induziert werden (Gordon et al., 2007). Zur Sicherung der Tumorzellintegrität ist das synergistische Agieren der IAPs sowie Mitgliedern der TNF-Familie wahrscheinlich und ähnliche Effekte auch nach Stimulation des CD95-Rezeptors denkbar.

So fand sich bei dieser Arbeit in drei von sechs Melanomzelllinien nach der Stimulation des CD95-Rezeptors mit CH-11 eine gesteigerte Proteinexpression bzw. Proteinspaltung. In A-375 fand sich eine gesteigerte Expression von FLIP, in MeWo eine Expressionssteigerung von Livin. In Mel-HO kommt es nach Stimulation zur Spaltung von Livin (siehe Abb. 3.27).

Obwohl die Melanomzelllinie A-375 nach CH-11-Behandlung eine gesteigerte FLIP-Expression aufwies, reagiert diese mit Apoptose und nicht wie erwartet mit der Inhibierung der Apoptose. Wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert wurde, wäre eine gesteigerte Expression der Isoform FLIP_L eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens. FLIP hemmt die Bindung von Procaspase-8 und -10 an den DISC und verhindert somit deren Aktivierung, wohingegen die Isoform FLIP_L nicht nur als Inhibitor der Apoptose, sondern auch als Aktivator der Procaspasen-8 und -10 aufzutreten scheint (Scaffidi et al., 1999; Yang et al., 2007; Boatright et al., 2003; Micheau et al., 2002).

MeWo reagiert auf den apoptotischen Stimulus mit CH-11 bei gesteigerter Livin-Expression entsprechend resistent. Livin hat eine Caspasen- aber auch Smac-inhibierende Fähigkeit, durch die die proapoptotischen Wirkungen inhibiert werden und die Apoptose unterbunden wird (Vucic et al., 2000; 2005). Mel-HO hingegen zeigt nach der Stimulation des CD95-Rezeptors eine Spaltung des Proteins. Es wurde auch in

anderen Arbeiten von Proteinspaltungen berichtet. Es wird von einer Caspasen-vermittelten Spaltung ausgegangen. Für XIAP und cIAP1 konnte trotz Spaltung ein Persistieren der antiapoptotischen Eigenschaften gefunden werden, wohingegen für Livin, entsprechend dem hiesigen Ergebnis, nach Proteinspaltung der Verlust antiapoptotischer Funktionen und der Erwerb proapoptotischer Fähigkeiten beschrieben wurde (Clem et al., 2001; Deveraux et al., 1999; Nachmias et al., 2003).

4.8 In Melanozyten Hemmung der IAPs durch iNOS möglich

Nachdem in verschiedenen Zelltypen (murinen Melanomzellen, Brustkrebszellen, murinen Makrophagen und Pankreaszellen von Ratten) eine Korrelation zwischen der Apoptose und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) gefunden wurde, deuteten mehrere Untersuchungen auf eine Veränderung der iNOS-Expression bei Tumorprogression hin (Xie et al., 1997; Binder et al., 1999; Dimmeler und Zeiher, 1997). So fanden sich bei ursprünglichen Zelllinien (humanen Melanozyten und murinen Melanomzellen) nach Induktion der iNOS-Expression mit Zytokinen, TNF- α und LPS Veränderungen mit NO-Anstieg, Bcl-2-Abfall und gesteigerter Apoptose, die in maligne veränderten bzw. metastasierten Zelllinien nicht mehr nachzuweisen waren (Xie et al., 1997; Fecker et al., 2002; Mocellin et al., 2004). Die Vermutung lag daher nahe, dass die fehlerhafte Regulation von iNOS eine Bedeutung für die Melanozytentransformation und Tumorprogression hat.

iNOS kann über Zinkfinger-Strukturen, aber auch über die Hochregulation der Transkriptionsfaktoren p53 und NF- κ B, zu einer Transkription von antiapoptotischen Genen, und so auch der IAPs, führen (Kröncke et al., 1998; Zhang et al., 1994; Rayet und Gelinas, 1999). Durch NOS wird unter Verbrauch von NADPH aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff NO hergestellt.

NO ist ein freies Radikal, das mit anderen freien Radikalen, molekularem Sauerstoff und Schwermetallen interagieren kann. Es kann beispielsweise zu Nitrit, Nitrat, und Peroxynitrit reagieren und durch Zerstörung der DNA genotoxische Effekte haben (Wink et al., 1991). Weiterhin kann es durch Hochregulation des Wachstumsfaktors VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) die Angiogenese fördern und durch Hochregulation von p53 und dem DNA-Reparaturenzym PARP Tumor-DNA-Reparaturmechanismen modulieren (Jadeski et al., 2000; Zhang et al., 1994).

Andererseits kann NO die zentralen Mediatoren des Apoptoseprozesses, wie z.B. die Caspasen, direkt hemmen (Dimmeler und Zeiher, 1997).

In Proteinen ist die Aminosäure Cystein der Hauptreaktionspartner von NO. Die SH-Gruppen des Cysteins bilden Fe-S- und Zn-S-Cluster, die zur Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur vieler Proteine dienen (Kröncke, 2001). Fe-S-Cluster befinden sich meist innerhalb oder in der Nähe katalytischer Zentren und können durch Nitrosierung inaktiviert werden (Caselli et al., 1994). Zn-S-Cluster bilden dagegen relativ stabile Domänen, die als so genannte Zinkfinger mit der DNS, RNS oder Proteinen in Interaktion treten können (Klug und Schwabe, 1995). Die Zinkfinger werden durch NO nicht irreversibel zerstört, sondern über das zelluläre Redoxsystem wieder regeneriert (Kröncke, 2001). Durch NO kann es jedoch zur Hemmung der spezifischen Bindung an die DNS und so zur Inaktivierung oder Transkription von Genen kommen.

Da die IAPs über bis zu drei Cystein-reiche Zinkfinger-Domänen (BIR(*baculoviral IAP repeat*)-Domänen) verfügen, die für Ihre antiapoptotischen Eigenschaften entscheidend sind, wäre es möglich, dass diese in Melanozyten nach Behandlung mit Zytokinen durch iNOS-Überexpression direkt oder indirekt gehemmt werden und die Apoptose eingeleitet werden kann. Demnach könnten die IAPs in Melanomzellen bei fehlender Induktion der iNOS-Expression ungehindert agieren. Ob es einen Zusammenhang zwischen der iNOS- und der IAP-Expression gibt, können erst weitere Untersuchungen offen legen.

4.9 Ausblick

Das Melanom der Haut ist als hoch maligner und weitgehend therapieresistenter Tumor bekannt. Als eine der Hauptursachen für die Therapieresistenz gilt die Entwicklung einer Apoptosedefizienz der Krebszellen. Für neue Therapieansätze ist daher die Aufklärung der Apoptosesignalwege von entscheidender Bedeutung. Nur mit einer maximalen apoptotischen Aktivierung der Tumorzellen können sich rasch entwickelnde Resistenzmechanismen vermieden und Erfolg versprechende zytotoxische Behandlungskonzepte für diese hochmalignen Tumoren gewonnen werden. Zu den Regulatoren der Apoptose zählen die antiapoptotischen Caspaseninhibitoren der Gruppe der IAPs, FLIP sowie die proapoptotischen Proteine AIF und Smac. Mit Hinblick auf die Entwicklung therapeutischer Strategien sollten die Ansätze dieser Arbeit

ausgebaut werden. Daher sind die expliziten Expressions-Verhältnisse der einzelnen FLIP-Varianten zu analysieren, die Proteinbindungsstruktur zwischen Livin und Smac, Survivin und AIF aufzuklären und der Einfluss von iNOS auf die Expression der antiapoptotischen Proteine zu untersuchen. Dies sollte Grundlage für die Klärung der Resistenzentwicklung von Melanomzellen sein, um entsprechende therapeutische Maßnahme ergreifen zu können.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Das Melanom ist ein hoch maligner Tumor, der sich gegenüber gängigen Behandlungsmethoden weitgehend resistent erweist. Die Therapieresistenz beruht dabei vor allem auf der Entwicklung einer Apoptosedefizienz. Ziel dieser Arbeit war die Darstellung einzelner apoptotischer Regulationsprozesse im Gesamtkontext der Apoptose. Hierzu wurde einerseits die Wirksamkeit Apoptose-induzierender Stimuli auf Melanozyten und Melanomzellen quantifiziert und andererseits deren Einfluss auf die Expression einzelner Apoptoseregulatoren in kultivierten normalen humanen Melanozyten und Melanomzellen untersucht und verglichen.

Die Melanomzelllinien zeigten zum Teil Resistenzen gegenüber der Apoptoseinduktion mit CH-11, IFN- γ (*Interferon- γ*), LPS (*Lipopolysaccharide*) und TNF- α (*Tumornekrosefaktor- α*), so dass zwischen resistenten und sensitiven Melanomzelllinien unterschieden werden konnte. In allen untersuchten Melanomzelllinien konnte im Gegensatz zu Melanozyten eine stärkere Expression der IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*) sowie von cFLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*) und Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) gefunden werden, wobei Livin nicht in allen Melanomzelllinien exprimiert wurde. Die allgemeine Überexpression der IAPs in Melanomzellen könnte durch die fehlende iNOS (*induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase*)-Expression begründet sein. Das proapoptotische AIF (*apoptosis inducing factor*) wurde hingegen in Melanomzellen schwächer als in Melanozyten exprimiert.

Da sich zwischen sensitiven und resistenten Melanomzelllinien deutliche Expressionsunterschiede der anti- und proapoptotischen Proteine fanden, konnten mehrere Hypothesen zur Resistenzentwicklung aufgestellt werden.

So könnte die Überexpression von Survivin für die Apoptoseresistenz bestimmter Tumoren verantwortlich sein. So fand sich in den untersuchten Zelllinien eine gegenläufige Expression des antiapoptotischen Survivin und des proapoptotischen Smac. In resistenten Melanomzelllinien lag eine starke Survivin- und schwache Smac-Expression vor. Survivin interagiert mit XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) und unterbindet auf diesem Weg die apoptotische Wirkung von Smac. Es gibt in der

vorangegangenen Literatur jedoch auch Hinweise für eine direkte Interaktion mit Smac. Weiterhin konnten in dieser Untersuchung der negative Einfluss von Survivin auf die AIF-Expression bestätigt werden. Survivin antagonisiert das proapoptotische Verhalten von AIF. Eine Erklärung für die Resistenzentwicklung ließ sich hierdurch jedoch nicht finden. AIF und Smac zeigten eine gegenläufige Expression, für die in der bisherigen Literatur durch eine direkte Interaktion keine Erklärung gefunden werden konnte. Übereinstimmend mit vorangegangenen Untersuchungen ließ sich auch für Livin und Smac eine gegenläufige Expression finden. In den Melanomzelllinien mit starker Livin-Expression fand sich nur eine schwache Smac-Expression. Livin dient bereits als therapeutischer Marker.

Eine weitere Begründung für die Resistenzentwicklung von Melanomzellen könnte in der hohen cFLIP-Expression gefunden werden. Bei nur schwacher Expression von cFLIP zeigten sich die untersuchten Melanomzelllinien, bis auf eine Zelllinie, sensitiv gegenüber den Apoptosestimuli.

Zur Untersuchung der Überexpression von CD95L auf die Apoptoseregulation wurde ein Tetracyclin-abhängiges Expressionssystem genutzt. Verwendet wurde die Melanomzelllinie SK-Mel-13, die mit dem Gen für CD95L stabil transfiziert wurde. Die Melanomzellen wurden dadurch für zusätzliche Apoptosestimuli signifikant sensitiviert, wobei sich die zweifach transfizierte Zelllinie SKM13-CD95L vor Aktivierung des Promotors mit Doxycyclin auf die Induktion der Apoptose resistent zeigte. Die überlebenden Zellen könnten auf Resistenz gegenüber dem selbst produzierten CD95L selektiert worden sein und somit die Apoptoseresistenz erklären. Es wird dabei von einer geringen Basalexpression des Transgens ausgegangen („leaky“-Expression). Die Resistenzentwicklung scheint dabei unabhängig von den Expressionsveränderungen der pro- und antiapoptotischen Proteine zu sein.

Die antiapoptotischen Caspaseninhibitoren der Gruppe der IAPs, FLIP sowie die proapoptotischen Proteine AIF und Smac haben als Regulatoren der Apoptose entscheidenden Einfluss auf die Resistenzentwicklungen des malignen Melanoms. Mit Hinblick auf die Entwicklung therapeutischer Strategien wäre es interessant und wünschenswert die Ansätze dieser Arbeit weiter auszubauen. Nur durch die Aufklärung der genauen zellulären Abläufe können alte Therapieformen optimiert und neue Therapiekonzepte entwickelt werden.

5.2 Summary

Melanoma is a highly malignant tumor which is resistant to most usual therapies. This resistance is mainly due to a reduction of apoptosis in melanoma cells. Aim of this study was to analyze specific pathway steps of apoptosis in normal melanocytes and malignant melanoma cells. We therefore quantified and compared the efficacy of apoptosis inducing stimuli on melanocytes and melanoma cells. Furthermore we analyzed changes in expression of regulators of apoptosis in both cell types.

Since the melanoma cells showed partial resistances to the induction of apoptosis by CH-11, IFN- γ (*Interferon- γ*), LPS (*lipopolysaccharide*) und TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) we could distinguish resistant and sensitive melanoma cell lines. In contrast to melanocytes we found in all examined melanoma cells a stronger expression of IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*), of cFLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*) and of Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*). However, Livin was not expressed in all melanoma cell lines.

The overall increased expression of IAP in melanoma cells may be explained by a missing iNOS (*inducible nitric oxide synthase*)-expression in these cells. On the other hand, the pro-apoptotic AIF (*apoptosis inducing factor*) was expressed much weaker in melanoma cells than in normal melanocytes.

As we found strong distinctions of expression of anti- and proapoptotic proteins between sensitive and resistant melanoma cells, we can formulate several hypothesis that may explain how resistance of melanoma cells to induction of apoptosis may have developed.

One explanation could be an overexpression of the anti-apoptotic protein Survivin. We found a reciprocal expression of antiapoptotic Survivin and of proapoptotic Smac. Within the resistant melanoma cell lines we observed a strong expression of Survivin and a weak expression of Smac. Survivin inhibits the apoptotic impact of Smac by interacting with XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Furthermore it inhibits AIF-expression and antagonizes the pro-apoptotic effect of AIF. Yet, this mechanism does not completely explain the development of resistance of melanocytes towards apoptosis induction.

AIF and Smac showed reciprocal expression for which up to today there has not been found a proper explanation. The reciprocal expression of Livin and Smac on the other hand has been described by others previously. In this study, melanoma cell lines with strong Livin expression showed only mild Smac expression. Livin is already being used as a diagnostic marker.

Another reason for the development of resistance to apoptosis may be the high cFLIP expression on melanoma cells. When showing a weak expression of cFLIP all but one of the melanoma cell lines we investigated, were found to be sensitive to stimuli of apoptosis.

In order to investigate the effect of CD95L-overexpression on apoptosis regulation we used a tetracyclin regulated expression system. SK-Mel-13, a melanoma cell line that is transfected with the gene encoding for CD95L, was used for this investigation. Through this transfection the melanoma cells became more sensitive to apoptosis stimuli. The twice transfected cell line SKM13-CD95L in contrast was – prior to activation the promotor gene of apoptosis with doxycycline - resistant to apoptosis induction. A possible explanation may be that the survived cell lines had been selected in advance due to their resistance to their own CD95L. A feeble basic expression of the transgene is quite assumable („leaky“-expression). The development of resistance seemed to develop independently from altered expression of pro- and anti-apoptotic proteins.

The anti-apoptotic IAPs and FLIP as well as the pro-apoptotic proteins AIF and Smac do have a major influence on regulating apoptosis and on the development of resistance in malignant melanoma cells. Further studies will be needed to understand the exact cellular and molecular mechanisms of apoptosis in order to optimize and develop new strategies to treat malignant melanoma.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. (2001).** *Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern.* FEBS Lett. 495, 1-2: 56-60.
2. **Adams JM und Cory S. (1998).** *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.* Science. 281: 1322-1326.
3. **Aggarwal BB. (2003).** *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.* Nat Rev Immunol. 3: 745-756.
4. **Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, Lee TH. (2001).** *Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression.* J Biol Chem. 276, 50: 47100-47106.
5. **Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, Feng Y. (2006).** *Inhibition of surviving reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer.* Cancer. 107: 746-756.
6. **Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. (1996).** *Human ICE/CED-3 protease nomenclature.* Cell. 87: 171.
7. **Altieri DC. (2001).** *The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy.* Trends Mol Med. 7: 542-547.
8. **Ambrosini G, Adida C and Altieri DC. (1997).** *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.* Nat. Med. 3: 917-921.
9. **Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. (2004).** *Augmenting Chemosensitivity of Malignant Melanoma Tumors via Proteasome Inhibition: Implication for Bortezomib (VELCADE, PS-341) as a Therapeutic Agent for Malignant Melanoma.* Cancer Research. 64, 14: 4912-4918.
10. **Andersson J, Björk L, Dinarello CA, Towbin H, Andersson U. (1992).** *Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell.* Eur J Immunol. 22, 10: 2617-2623.
11. **Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C. (1997).** *Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm.* J Cell Sci. 110, 3: 369-378.
12. **Asadullah K, Sterry W, Trefzer U. (2002).** *Cytokines: Interleukin and interferon therapy in dermatology.* Clin Exp Dermatol. 27, 7: 578-584.
13. **Ashkenazi A und Dixit VM. (1998).** *Death receptors: Signaling and modulation.* Science. 281: 1305-1308.

14. **Aubert C, Rouge F, Reillaudou M, Metge P. (1993).** *Establishment and characterization of human ocular melanoma cell lines.* Int J Cancer. 54: 784-792.
15. **Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. (2001).** *Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma.* J Clin Oncol. 19, 16: 3635-3648.
16. **Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. (1993).** *Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation.* Cell. 73, 3: 431-445.
17. **Bao ST, Gui SQ, Lin MS. (2006).** *Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma.* Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 5, 4: 580-583.
18. **Barkett M und Gilmore TD. (1999).** *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene. 18, 49: 6910-6924.
19. **Baud V und Karin M. (2001).** *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.* Trends Cell Biol. 11, 9: 372-377.
20. **Beddingfield FC. (2003).** *The melanoma epidemic: res ipsa loquitur.* Oncologist. 8: 459.
21. **Binder C, Schulz M, Hiddemann W, Oellerich M. (1999).** *Caspase-activation and induction of inducible nitric oxide-synthase during TNF a-triggered apoptosis.* Anticancer Res. 19: 1715-1720.
22. **Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grutter MG. (1999).** *The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis.* Structure Fold Des. 7: 1125-1133.
23. **Boatright KM und Salvesen GS. (2003).** *Mechanisms of caspase activation.* Curr Opin Cell Biol. 15, 6: 725-731.
24. **Bockbrader KM, Tan M, Sun Y. (2005).** *A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells.* Oncogene. 24, 49: 7381-7388.
25. **Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. (2000).** *Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis.* Biochem Pharmacol. 60, 8: 1085-1089.
26. **Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D. (2003).** *Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells.* J Invest Dermatol. 120, 1: 48-55.

27. **Braun FK, Hirsch B, Al-Yacoub N, Dürkop H, Assaf C, Kadin ME, Sterry W, Eberle J. (2009).** *Resistance of Cutaneous Anaplastic Large-Cell Lymphoma Cells to Apoptosis by Death Ligands Is Enhanced by CD30-Mediated Overexpression of c-FLIP.* J Invest Dermatol.
28. **Bruggen J, Fogh J, Sorg C. (1981).** *Tumor production in the nude mouse, fibrinolytic activity and cross-reactivity with antimelanoma sera of various human tumor cell lines.* J Cancer Res Clin Oncol. 102: 141-152.
29. **Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E. (2007).** *Expression of surviving in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome.* Urology. 69: 34-37.
30. **Cameron DA, Cornbleet MC, Mackie RM, Hunter JA, Gore M, Hancock B, Smyth JF. (2001).** *Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma - the Scottish study.* Br J Cancer. 84: 1146.
31. **Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. (2004).** *Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all.* Cell Death Differ. 11: 591-595.
32. **Canu N und Calissano P. (2003).** *In vitro cultured neurons for molecular studies correlating apoptosis with events related to Alzheimer disease.* Cerebellum. 2: 270-278.
33. **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.* Proc Natl Acad Sci U S A. 73: 3278-3282.
34. **Carson DA und Ribeiro JM. (1993).** *Apoptosis and disease.* Lancet. 341: 1251-1254.
35. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975).** *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A. 72, 9: 3666-3670.
36. **Caselli A, Camici G, Manao G, Moneti G, Pazzagli L, Cappugi G, Ramponi G. (1994).** *Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase.* J.Biol.Chem. 269: 24878-24882.
37. **Chang DW, Ditsworth D, Liu H, Srinivasula SM, Alnemri ES, Yang X. (2003).** *Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases.* J Biol Chem. 278, 19: 16466-16469.
38. **Chang H und Schimmer AD. (2007).** *Survivin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy.* Mol Cancer Ther. 6, 1: 24-30.
39. **Chao DT und Korsmeyer SJ. (1998).** *BCL-2 family: regulators of cell death.* Annu Rev Immunol. 16: 395-419.

40. **Chaudhary PM, Jasmin A, Eby MT, Hood L. (1999).** *Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins.* *Oncogene.* 18: 5738-5746.
41. **Chauhan D, Neri P, Velankar M, Podar K, Hideshima T, Fulciniti M, Tassone P, Raje N, Mitsiades C, Mitsiades N, Richardson P, Zavel L, Tran M, Munshi N, Anderson KC. (2007).** *Targeting mitochondrial factor Smac/DIABLO as therapy for multiple myeloma (MM).* *Blood.* 109, 3: 1220-1227.
42. **Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. (2004).** *Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis.* *Cell Death Differ.* 11, 8: 915-923.
43. **Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. (1999).** *A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells.* *Biochem Biophys Res Commun.* 264, 3: 847-854.
44. **Choi J, Hwang YK, Sung KW, Lee SH, Yoo KH, Jung HL, Koo HH, Kim HJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS. (2007).** *Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia.* *Blood.* 109, 2: 471-477.
45. **Clem RJ, Sheu TT, Richter BW, He WW, Thornberry NA, Duckett CS, Hardwick JM. (2001).** *c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment.* *J Biol Chem.* 276, 10: 7602-7608.
46. **Cohen G. (1997).** *Caspases: The executioners of apoptosis.* *Biochem. J.* 326: 1-16.
47. **Cooke JP und Tsao PS. (1993).** *Cytoprotective effects of nitric oxide.* *Circulation.* 88: 2451-2454.
48. **Crook NE, Clem RJ, Miller LK. (1993).** *An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger like motif.* *J Virol.* 67: 2168-2174.
49. **Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D. (2003).** *Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins.* *Essays Biochem.* 39: 73-88.
50. **Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. (2001).** *The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy.* *Leukemia.* 15, 7: 1022-1032.
51. **Daniel PT. (2000).** *Dissecting the pathways to death.* *Leukemia.* 14, 12: 2035-2044.
52. **Day TW, Najafi F, Wu CH, Safa AR. (2006).** *CellularFLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): A novel target for Taxol-induced apoptosis.* *Biochem. Pharmacol.* 71: 1551-1561.

53. **Deveraux QL und Reed JC. (1999).** *IAP family proteins--suppressors of apoptosis.* Genes Dev. 13, 3: 239-252.
54. **Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. (1999).** *Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases.* EMBO J. 18: 5242–5251.
55. **Dimmeler S und Zeiher AM. (1997).** *Nitric oxide and apoptosis: Another paradigm for the double-edged role of nitric oxide.* Nitric Oxide. 1: 275-281,
56. **Dobrovolskaia MA, Vogel SN. (2002).** *Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS.* Microbes Infect. 4, 9: 903-914.
57. **Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC. (2004).** *An IAP-IAP complex inhibits apoptosis.* J Biol Chem. 279, 33: 34087-34090.
58. **Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000).** *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.* Cell. 102: 33-42.
59. **Du L, Zhang X, Han YY, Burke NA, Kochanek PM, Watkins SC, Graham SH, Carcillo JA, Szabo C, Clark RS. (2003).** *Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress.* J Biol Chem. 278: 18426-18433.
60. **Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. (1996).** *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors.* EMBO J. 15, 11: 2685-2694.
61. **Duckett CS. (2005).** *IAP proteins: sticking it to Smac.* Biochem J. 385:1-2.
62. **Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. (1999).** *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.* Annu Rev Biochem. 68: 383-424.
63. **Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Kurbanov BM, Fechner H. (2008).** *Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma.* Exp Dermatol. 17, 1: 1-11.
64. **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, 57: 9131-9141.
65. **Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF. (2007).** *Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches.* Drug Resist Updat. 10, 6: 218-234.

66. **Eckhart L, Ban J, Fischer H und Tschachler E. (2000).** *Caspase-14: analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation.* Biochem Biophys Res Commun. 277: 655-659.
67. **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998).** *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.* Nature. 391: 43-50.
68. **Fandy TE, Shankar S, Srivastava RK. (2008).** *Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells.* Mol Cancer. 7: 60.
69. **Fecker LF, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. (2002).** *Inducible Nitric Oxide Synthase is Expressed in Normal Human Melanocytes but Not in Melanoma Cells in Response to Tumor Necrosis Factor- α , Interferon- γ , and Lipopolysaccharide.* J. of investigative dermatology. 118, 6: 1019-1025.
70. **Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. (2003).** *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates.* Cell Death Differ. 10: 76-100.
71. **Furchgott RF und Zawadzki JV. (1980).** *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature. 288: 373-376.
72. **Garbe C. (2005).** *Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
73. **Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, Shroyer KR. (2001).** *Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa.* Hum. Pathol. 32: 119-125.
74. **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.* J Natl Cancer Inst. 51: 1417-1423.
75. **Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. (2005).** *c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis.* J. Biol. Chem. 280:14507-14513.
76. **Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN. (2006).** *The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF- κ B activation.* Journal of Experimental Medicine. 203, 5: 1295-1305.
77. **Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, Dong L, Yeap BY, Sugarbaker DJ, Bueno R. (2007).** *Inhibitor of apoptosis proteins are regulated by tumour necrosis factor- α in malignant pleural mesothelioma.* J Pathol. 211, 4: 439-446.
78. **Gossen M und Bujard H. (1992).** *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.* Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 5547-5551.

79. **Gossen M und Bujard H. (1995).** *Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary.* Biotechniques. 19: 213.
80. **Gougeon ML. (2003).** *Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack.* Nat Rev. Immunol. 3: 392-404.
81. **Green DR und Kroemer G. (2004).** *The pathophysiology of mitochondrial cell death.* Science. 305, 5684: 626-629.
82. **Green DR und Reed JC. (1998).** *Mitochondria and apoptosis.* Science. 281, 5381: 1309-1312.
83. **Grell M. (1995-1996).** *Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF.* J Inflamm. 47, 1-2: 8-17.
84. **Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. (1995).** *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.* Science. 270, 5239: 1189-1192.
85. **Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C. (2003).** *Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor.* Oncogene. 22: 6669-6678.
86. **Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. (1996).** *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape.* Science. 274, 5291: 1363-1366.
87. **Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VEA, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT. (1996).** *Apoptosis: molecular regulation of cell death.* Eur. J. Biochem. 236: 1-26.
88. **Heigold S, Sers C, Bechtel W, Ivanovas B, Schäfer R and Bauer G. (2002).** *Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to nontransformed fibroblasts.* Carcinogenesis. 23: 929-941.
89. **Hengartner MO. (2000).** *The biochemistry of apoptosis.* Nature. 407, 6805: 770-776.
90. **Hids MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL. (1999).** *Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat.* Nat Struct Biol. 6: 648-651.
91. **Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, Binder BR, Lipp J, de Martin R. (2000).** *Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1.* J Biol Chem. 275, 29: 22064-22068.
92. **Hoffman RA, Langrehr JM, Wren SM, Dull KE, Ildstad ST, McCarthy SA, Simmons RL. (1993).** *Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease.* J. Immunol. 151: 1508-1518.

93. **Hogg N und Kalyanaraman B. (1999).** *Nitric oxide and lipid peroxidation.* Biochem. Biophys. Acta. 1411: 378-384.
94. **Holzmann B, Lehmann JM, Ziegler-Heitbrock HW, Funke I, Riethmuller G, Johnson JP. (1988).** *Glycoprotein P3.58, associated with tumor progression in malignant melanoma, is a novel leukocyte activation antigen.* Int J Cancer. 41: 542-547.
95. **Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. (2004).** *Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling.* Trends Pharmacol Sci. 25: 259-264.
96. **Hu WH, Johnson H, Shu HB. (2000)** *Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8.* J Biol Chem. 275: 10838-10844.
97. **Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer J L, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French L E, Tschopp J. (1997).** *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.* Nature. 388: 190–195.
98. **Jacobson MD, Weil M, Raff MC. (1997).** *Programmes Cell Death in Animal Development.* Cell. 88: 347-354.
99. **Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala PK. (2000).** *Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis.* Int J Cancer. 86: 30 –39.
100. **Johnson DE, Gastman BR, Wieckowski E, Wang GQ, Amoscato A, Delach SM, Rabinowich H. (2000).** *Inhibitor of apoptosis protein hIAP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis.* Cancer Res. 60: 1818-1823.
101. **Kasof GM und Gomes BC. (2001).** *Survivin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member.* J Biol Chem. 276, 5: 3238-3246.
102. **Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. (2000).** *The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways.* Curr Biol. 10, 11: 640-648.
103. **Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. (2001).** *Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy.* Int J Cancer. 95, 2: 92-95.
104. **Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, Thomas J, Proebstle TM, Schmittel A, Schadendorf D, Velu T, Negrier S, Kleeberg U, Lehman F, Suci S, Eggermont AM. (2005).** *Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group.* J Clin Oncol. 23, 27: 6747-6755.

105. **Kerr JF, Wyllie H, Currie AR. (1972).** *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br. J. Cancer. 26: 239-257.
106. **Klug A und Schwabe JW. (1995).** *Protein motifs 5. Zinc fingers.* FASEB J. 9: 597-604.
107. **Kluger HM, McCarthy MM, Alvero AB, Sznol M, Ariyan S, Camp RL, Rimm DL, Mor G. (2007).** *The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by Phenoxodiol is associated with Carboplatin sensitization.* J Transl Med. 5: 6.
108. **Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, and Beckman JS. (1992).** *Peroxynitrite a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide.* Chem. Res. Toxicol. 5: 834-842.
109. **Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. (1993).** *Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death.* Semin Cancer Biol. 4: 327-332.
110. **Krammer PH. (2000a).** *Apoptose.* Dt. Ärzteblatt. 97: 1752-1759.
111. **Krammer PH. (2000b).** *CD95's deadly mission in the immune system.* Nature. 407: 789-795.
112. **Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. (1997).** *Mitochondrial control of apoptosis.* Immunol. Today. 18: 44-51.
113. **Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. (1998).** *Inducible nitric oxide synthase in human diseases.* Clin.Exp.Immunol. 113: 147-156.
114. **Kröncke KD. (2001).** *Cysteine-Zn²⁺ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO.* FASEB J. 15: 2503-2507.
115. **Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer P H, Kirchhoff S. (2001).** *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase 8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex.* J Biol Chem. 276: 20633–20640.
116. **Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Pfeilschifter J. (1996).** *Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 betastimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93: 255-259.
117. **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, 23: 3364-3377.

118. **LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. (1998).** *The inhibitor of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.* Oncogene. 17: 3247-3259.
119. **Laemmli UK. (1970).** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. 227: 680-685.
120. **Lancaster JR Jr. (1994).** *Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91: 8137-8141.
121. **Lane DP. (1992).** *Cancer. p53, guardian of the genome.* Nature. 358, 6381: 15-16.
122. **Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C. (2003).** *Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation.* Immunity. 18: 655-664.
123. **Lewis J, Burstein E, Reffey SB, Bratton SB, Roberts AB, Duckett CS. (2004).** *Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis.* J Biol Chem. 279, 10: 9023-9029.
124. **Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC and Altieri DC. (1998).** *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.* Nature. 396: 580-584.
125. **Liguang Z, Peishu L, Hongluan M, Hong J, Rong W, Wachtel MS, Frezza EE. (2007).** *Survivin expression in ovarian cancer.* Exp. Oncol. 29: 121-125.
126. **Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J. (2000).** *KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family.* Biochem Biophys Res Commun. 279, 3: 820-831.
127. **Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG. (2001).** *Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.* Nat Cell Biol. 3, 2: 128-133.
128. **Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. (1996).** *Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes.* Nature. 379: 349-353.
129. **Liu T, Brouha B, Grossman D. (2004).** *Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells.* Oncogene. 23, 1: 39-48.
130. **Lockshin A, Giovanella BC, De Ipolyi PD, Williams LJ, Jr., Mendoza JT, Yim SO, Stehlin JS Jr. (1985).** *Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma.* Cancer Res. 45: 345-350.

131. **Lockshin RA und Williams CM. (1965).** *Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms.* J. Insect. Physiol. 11: 803-809.
132. **Loscalzo J und Welch G. (1995).** *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system.* Prog. Cardiovasc. Dis. 38: 87-104.
133. **Lu B, Gonzales A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, Hallahan DE. (2004).** *Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer.* Br. J. Cancer. 91: 537-540.
134. **Lu M, Lin SC, Huang Y, Kang YJ, Rich R, Lo YC, Myszka D, Han J, Wu H. (2007).** *XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization.* Mol Cell. 26, 5: 689-702.
135. **Mahoney JA und Rosen A. (2005).** *Apoptosis and autoimmunity.* Curr Opin Immunol. 17: 583-588.
136. **Mannel DN und Echtenacher B. (2000).** *TNF in the inflammatory response.* Chem Immunol. 74: 141-161.
137. **Mano T, Luo Z, Suhara T, Smith RC, Esser S, Walsh K. (2000).** Expression of wild-type and noncleavable Fas ligand by tetracycline-regulated adenoviral vectors to limit intimal hyperplasia in vascular lesions. Hum Gene Ther. 11, 12: 1625-1635.
138. **May MJ und Ghosh S. (1997).** *Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview.* Semin Cancer Biol. 8: 63-73.
139. **McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esche EP, Little JH, MacLennan R. (1986).** *The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification,* Pathology. 18: 12-21.
140. **Micheau O und Tschopp J. (2003).** *Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes.* Cell. 114: 181-190.
141. **Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG. (2002)** *The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex.* J. Biol. Chem. 277: 45162–45171.
142. **Midis GP, Shen Y, Owen-Schaub LB. (1996).** *Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy.* Cancer Res. 56, 17: 3870-3874.
143. **Mizuguchi H und Hayakawa T. (2001).** Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. Biochim Biophys Acta. 1568, 1: 21-29.

144. **Mocellin S, Provengano M, Rossi CR, Pilati P, Scalerta R, Lise M, Nitti D. (2004).** *Induction of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Melanoma Sensitizes Endothelial Cells to Tumor Necrosis Factor-Driven Cytotoxicity.* Clin Cancer Res. 10: 6879-6886.
145. **Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, Peretz T, Mandelboim O, Ben-Yehuda D. (2003).** *Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma.* Cancer Res. 63, 19: 6340-6349.
146. **Nicholson DW und Thornberry NA. (1997).** *Caspases: Killer proteases.* TIBS. 22: 299-306.
147. **Ogura A, Watanabe Y, Iizuka D, Yasui H, Amitani M, Kobayashi S, Kuwabara M, Inanami O. (2008).** *Radiation-induced apoptosis of tumor cells is facilitated by inhibition of the interaction between Survivin and Smac/DIABLO.* Cancer Lett. 259, 1: 71-81.
148. **Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa WC. (2002).** *Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway.* J Biol Chem. 275, 13: 9102-9105.
149. **Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. (2007).** *The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation.* Annu Rev Immunol.
150. **Parratt JR. (1998).** *Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia.* J Antimicrob Chemother. 41 Suppl A: 31-9.
151. **Paus R, Menrad A, Czarnetzki BM. (1995).** *Nekrobiologie der Haut: Apoptose.* Hautarzt. 46: 285-303.
152. **Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, George-Hyslop P, Tandon A. (2005).** *Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations.* J Biol Chem. 280: 34025-34032.
153. **Petrucci E, Pasquini L, Petronelli A, Saulle E, Mariani G, Riccioni R, Biffoni M, Ferretti G, Benedetti-Panici P, Cognetti F, Scambia G, Humphreys R, Peschle C, Testa U. (2007).** *A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL-mediated cell death of ovarian cancer cells.* Gynecol Oncol. 105, 2: 481-492.
154. **Philipp-Staheli J, Kim KH, Liggitt D, Gurley KE, Longton G, Kemp CJ. (2004).** *Distinct roles for p53, p27Kip1, and p21Cip1 during tumor development.* Oncogene. 23: 905-913.
155. **Puche JG, Canevari S, Fossati G, Porta GD, Vezzoni P. (1977).** *Complement-dependent serum cytotoxicity of cancer patients studied by ⁵¹Cr release assay on human cancer lines.* Tumori. 63: 97-108.

156. **Raisova M, Bektas M, Wider T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. (2000).** *Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release.* FEBS Letters. 473: 27-32.
157. **Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. (2001).** *The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis.* J Invest Dermatol. 117, 2: 333-340.
158. **Rayet B und Gélinas C. (1999).** *Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer.* Oncogene. 18, 49: 6938-47.
159. **Rendahl KG, Leff SE, Otten GR, Spratt SK, Bohl D, Van Roey M, Donahue BA, Cohen LK, Mandel RJ, Danos O, Snyder RO. (1998).** *Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors.* Nat Biotechnol. 16, 8: 757-761.
160. **Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, Frattini A, Tian L, Frank S, Youle RJ, Nelson DL, Notarangelo LD, Vezzone P, Fearnhead HO, Duckett CS. (2001).** *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family.* Mol. Cell. Biol. 21: 4292–4301.
161. **Riede UN und Schaefer HE. (1999).** *Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage,* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
162. **Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM. (2001).** *The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity.* J Cell Biol. 153: 221-228.
163. **Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. (1995).** *The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins.* Cell. 83, 7: 1243-1252.
164. **Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. (1997).** *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.* EMBO J. 16: 6914-6925
165. **Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. (1995).** *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy.* Cell. 80, 1: 167-178.
166. **Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. (1995).** *Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis.* Br.J.Pharmacol. 114: 1171-1178.
167. **Salvensen GS und Dixit VM. (1997).** *Caspases: Intracellular signaling by proteolysis.* Cell. 91: 443-446.

168. **Salvesen GS und Duckett CS. (2002).** *IAP proteins: blocking the road to death's door.* Nat Rev Mol Cell Biol. 3: 401-410.
169. **Satyamoorthy K, Chehab NH, Waterman MJ, Lien MC, El-Deiry WS, Herlyn M, Halazonetis TD. (2000).** *Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells.* Cell Growth Differ. 11, 9: 467-474.
170. **Scaffidi C, Schmitz I, Krammer P H, Peter M E. (1999).** *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.* J Biol Chem. 274: 1541–1548.
171. **Schröder K und Jaster R. (2004).** *Interferon-alpha inhibits interleukin-3-induced proliferation of Ba/F3 cells in a protein kinase R-dependent manner.* Cell Signal. 16, 2: 167-174.
172. **Schuchter LM. (2001).** *Review of the 2001 ajcc staging system for cutaneous malignant melanoma.* Curr. Oncol. Rep. 3: 332-337.
173. **Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. (2007).** *Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression and mortality.* Cancer. 109: 1106-1113.
174. **Sidransky D und Hollstein M. (1996).** *Clinical implications of the p53 gene.* Annu Rev Med. 47: 285-301.
175. **Siegelin MD, Siegelin Y, Habel A, Gaiser T. (2009).** *Genistein enhances proteasomal degradation of the short isoform of FLIP in malignant glioma cells and thereby augments TRAIL-mediated apoptosis.* Neurosci Lett. 453, 2: 92-97.
176. **Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, Verhagen AM, Vaux DL. (2002).** *The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites.* J Cell Biol. 157: 115-124.
177. **So HS, Jung BH, Yeum SS, Park JS, Kim MS, Lee JH, Chung SY, Choi S, Chae HJ, Kim HR, Ko CB, Chung HT, Park R. (2000).** *LPS induces direct death of IFN-gamma primed murine embryonic hepatocyte, BNL CL2 cells in a TNF-alpha independent manner.* Immunol Invest. 29, 4: 383-396.
178. **Soengas MS und Lowe SW. (2003).** *Apoptosis and melanoma chemoresistance.* Oncogene. 22, 20: 3138-3151.
179. **Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee R-A, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. (2001).** *A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis.* Nature. 410: 112-116.
180. **Stancovski I und Baltimore D. (1997).** *NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed?* Cell. 91, 3: 299-302.
181. **Strumberg D. (2005).** *Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment.* Drugs Today (Barc). 41, 12: 773-784.

182. **Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. (1995).** *Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage.* J Immunol. 154, 8: 3806-3813.
183. **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (1999).** *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* Nature. 397: 441-446.
184. **Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. (2000).** *Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation.* Oncogene. 19, 29: 3225-3234.
185. **Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. (2001).** *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes.* J Biol Chem. 276, 29: 27058-27063.
186. **Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. (1998).** *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.* Cancer Res. 58, 23: 5315-5320.
187. **Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. (1993).** *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.* Cell. 74, 5: 845-853.
188. **Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. (1998).** *Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function.* Biochemistry (Mosc). 63, 7: 766-781.
189. **Thornberry NA und Lazebnik Y. (1998).** *Caspases: Enemies within.* Science. 281: 1312-1316.
190. **Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. (1989).** *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.* Science. 245: 301-305.
191. **Tschopp J, Irmeler M, Thome M. (1998).** *Inhibition of fas death signals by FLIPs.* Curr. Opin. Immunol. 10: 552-558.
192. **Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. (1985).** *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.* Science. 228: 1440-1443.
193. **Unal-Cevik I, Kilinc M, Can A, Gursoy-Ozdemir Y und Dalkara T. (2004).** *Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia.* Stroke. 35: 2189-2194.
194. **Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. (1996).** *Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors.* Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 10: 4974-4978.

195. **Vaux DL und Silke J. (2003).** *Mammalian mitochondrial IAP binding proteins.* Biochem Biophys Res Commun. 304: 499-504.
196. **Vaux DL und Silke J. (2005).** *IAPs, RINGs and Ubiquitylation.* Nat Rev Mol Cell Biol. 6: 287-297.
197. **Vegran F, Biodot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. (2005).** *Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas.* Int J Oncol. 27: 1151-1157.
198. **Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL. (2000).** *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.* Cell. 102: 43-53.
199. **Vermes I und Haanen C. (1994).** *Apoptosis and programmed cell death in health and disease.* Adv Clin Chem. 31:177-246.
200. **Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. (2005).** *Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.* Ann Hematol. 84: 627-639.
201. **Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. (1997).** *Caspases and caspase inhibitors.* TIBS. 22, 10: 288-393.
202. **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. (2000).** *Surfing the p53 network.* Nature. 408, 6810: 307-310.
203. **Vogt C. (1842).** *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstriicians).* Solothurn.
204. **Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother WJ. (2005).** *Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP.* Biochem J. 385, 1: 11-20.
205. **Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. (2000).** *ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas.* Curr Biol. 10, 21: 1359-1366.
206. **Wajant H und Scheurich P. (2001).** *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling.* Int J Biochem Cell Biol. 33, 1: 19-32.
207. **Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003).** *Tumor necrosis factor signaling.* Cell Death Differ. 10: 45-65.
208. **Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. (1998).** *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.* Science. 281, 5383: 1680-1683.

209. **Wang JH, Redmond HP, Watson RW, Condron C, Bouchier-Hayes D. (1999).** *Involvement of tyrosine protein kinase in IFN-gamma-induced human endothelial cell apoptosis.* Shock. 11, 5: 311-318.
210. **Wheatley K, Ives N, Hancock B, Gore M. (2002).** *Interferon as adjuvant treatment for melanoma.* Lancet. 360: 878.
211. **Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, et al. (1991).** *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors.* Science. 254: 1001-1003.
212. **Wu X und Deng Y. (2002).** *Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis.* Front Biosci. 1, 7: 151-156.
213. **Xie K, Wang Y, Huang S, Xu L, Bielenberg D, Salas T, McConkey DJ, Jiang W, Fidler IJ. (1997).** *Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2.* Oncogene 15: 771-779.
214. **Yaar M und Gilchrist BA. (1991).** *Human melanocyte growth and differentiation: a decade of new data.* J Invest Dermatol. 97: 611-617.
215. **Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Wethkamp N, Liebmann J, Suschek CV, Guo Y, Gabbert HE, Gerharz CD, Ramp U. (2004).** *Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas.* Br J Cancer. 91, 7: 1349-1357.
216. **Yang BF, Xiao C, Li H, Yang SJ. (2007).** *Resistance to Fas-mediated apoptosis in malignant tumours is rescued by KN-93 and Cisplatin via Downregulation of c-FLIP-Expression and Phosphorylation.* Clin Exp Pharmacol Physiol. 34, 12: 1245-1251.
217. **Yang E und Korsmeyer SJ. (1996).** *Molecular Thanatopsis: A discourse on the Bcl-2-family and cell death.* Blood. 88: 386-401.
218. **Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. (2003).** *Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis.* Genes Dev. 17, 12: 1487-1496.
219. **Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. (2000).** *Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli.* Science. 288, 5467: 874-877.
220. **Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. (2002).** *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor.* Nat Struct Biol. 9: 680-684.
221. **Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. (1989).** *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.* J. Exp. Med. 169: 1747-1756.

222. **Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. (1999).** *A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis.* J Biol Chem. 274, 20: 13733-13736.
223. **Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM and Dawson VL. (2002).** *Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor.* Science. 297: 259-263.
224. **Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. (1993).** *The C.elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1- β -converting enzyme.* Cell. 75: 641-652.
225. **Zabel U und Baeuerle PA. (1990).** *Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA.* Cell. 61, 2: 255-265.
226. **Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. (2000).** *Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases.* Mol.Med. 6: 347-373.
227. **Zamzami N, Kroemer G. (2001).** *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 67-71.
228. **Zandi E und Karin M. (1999).** *Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I kappa B kinase complex.* Mol Cell Biol. 19, 7: 4547-4551.
229. **Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. (1994).** *Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity.* Science. 263: 687-689.
230. **Zong H, Yin B, Chen J, Ma B, Cai D, He X. (2009).** *Over-expression of c-FLIP confers the resistance to TRAIL-induced apoptosis on gallbladder carcinoma.* Tohoku J Exp Med. 217, 3: 203-208.
231. **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997).** *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrom c-dependent activation of caspase-3.* Cell. 90: 405-413.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist / killer
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia- 2
Bcl-X _L	Bcl-X (long form)
Bcl-X _S	Bcl-X (short form)
BCA	Bicinchoninic acid
bFGF	basic fibroblast growth factor
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne (bcl-2 homology 3)
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist
Bidest.	doppelt destilliertes Wasser
BIR	baculoviral IAP repeat
BIRC	Baculoviral IAP-repeat-containing Protein
BPE	Bovine pit. extract
BSA	bovine serum albumin
ca.	zirka
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cysteinreiche Aspartat-spezifische Proteinase
CD95L	CD95-Ligand
ced	cell death gene
CLAP	Caspase-like apoptosis regulatory protein
CO ₂	Kohlenmonoxid
C-terminal	kohlenstoff-terminal
D	Dalton
DD	Death domain
DED	Death effector domains
d.h.	das heißt

DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DTIC	(Dimethyltriazeno)imidazolcarboxamid (Decarbazin)
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDRF	endothelium-derived relaxing factor ()
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FADD	Fas-associating protein with death domain (MORT1)
Fas	Fibroblast associated antigen
FCS	fötales bovines Serum
Fe	Eisen
FLIP (cFLIP)	(cellular) FLICE inhibitory protein
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
h	Stunde
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins
ICE	Interleukin 1 β -converting enzyme
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
IKK	I κ B-Kinasen-Komplexes
ILP-2	IAP-like protein-2
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kD	kilo-Dalton
LBP	Lipopolysaccharid binding protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
Mio.	Million
MTP	Multititerplatte

NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
Nonidet P40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
N-terminal	aminoterminal
NRAGE	Neutrophin receptor-interacting melanoma antigen gene homologue
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rel.	relativ
RING	Really interesting new gene
RIP	Receptor interacting protein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Schwefel
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
SMA	spinalen Muskelatrophie
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
TAB1	TAK1-binding protein 1
TAK1	TGF β -activated protein kinase 1
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N',N'-tetramethylethylenediamin
TGF β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRADD	TNF-receptor associated death domain
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglykol-pisooctylphenoether
u.a.	unter anderem
UBC	Ubiquitin-conjugating enzyme
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XAF1	XIAP assoziated factor 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

8 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Julia Susanne Lenkeit, geb. am 22.12.1977, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression und Wechselwirkungen von Regulatoren der Apoptose in humanen Melanozyten und Melanomzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 03.05.2010

Julia Susanne Lenkeit

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch Unterstützung in jeglicher Form zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. C. Geilen und Herrn PD Dr. Eberle für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit der Promotion. Herr PD Dr. Eberle führte mich mit großem Engagement in die Welt der molekularbiologischen Forschung ein und unterstützte das Entstehen dieser Arbeit mit nicht nachlassendem Interesse, wertvollen Tipps und konstruktiver Kritik.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und das sehr angenehme und kollegiale Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt hier v. a. Lothar Fecker, Cornelia Schwarz und Amir Hossini für die geduldige Einarbeitung in die verwendeten Labortechniken und die stete Hilfe bei allen großen und kleinen Problemen „rund ums Labor“.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit immer unterstützten und ermutigten.

Vielen Dank!