

**Die TRAIL-Suszeptibilität humaner Melanomzellen:  
Bedeutung des Tumorprogressionsstadiums und Modulation  
durch Immunsuppressiva**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der  
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

BHARATHY THAYAPARASINGHAM

aus Jaffna (Sri Lanka)

Hauptberichter: PD Dr. Dagmar Kulms

Mitberichter: Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 7.05.2009

Institut für Zellbiologie und Immunologie

Universität Stuttgart

2009

**Eidesstattliche Erklärung :**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation

**Die TRAIL-Suszeptibilität humaner Melanomzellen: Bedeutung des  
Tumorprogressionsstadiums und Modulation durch Immunsuppressiva**

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Stuttgart, 19. Januar 2009

---

(Bharathy Thayaparasingham)

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

**Thayaparasingham B.**, Kunz A., Peters N., Kulms D.

“Sensitization of melanoma cells to TRAIL by UVB-induced and NF-kappaB-mediated downregulation of XIAP.” *Oncogene advance online publication*, 3 November 2008; doi:10.1038/onc.2008.397.

## **Danksagung**

Frau PD Dr. Dagmar Kulms danke ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für ihre Anregungen und die mir gewährte Unterstützung. Ihre Ratschläge waren mir stets eine große Hilfe.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich, der sich bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit mit zu bewerten.

Besonders möchte ich mich bei der Deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanken, was mir deren Durchführung überhaupt erst ermöglicht hat. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Friedegund Meier vom Institut für Dermatologische Onkologie der Universität Tübingen für die Bereitstellung der Melanomzelllinien und Melanozyten und Dr. Henning Walczak von der „Tumor Immunology Unit“ des Imperial College London für den TRAIL-Liganden. Bei Amgen / Genentech (Seattle, USA) möchte ich mich für die TRAIL-Antikörper bedanken und bei PD Dr. H. Kashkar (Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Köln) für die Bereitstellung des XIAP-pEGFPC3 Konstrukts.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie und Immunologie gilt mein herzlichster Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die freundschaftliche Kollegialität. Besonders bedanken möchte ich mich bei Sandra Barisic, Nathalie Peters, Carola Schwan, Alexandra Kunz und Carolin König für die vielen lustigen Stunden im Labor. Danken möchte ich auch Alexandra, Heike und Melanie für ihre Hilfe bei der Korrektur der Rechtschreibung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre Unterstützung das Studium ermöglicht haben und immer Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben.

## Inhaltsübersicht

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>10</b>
<b>I. Einleitung.....</b>	<b>14</b>
1.1 Aufbau und Funktion der Haut .....	14
1.2 Das Melanom.....	15
1.2.1 Melanom-Progression.....	15
1.3 Apoptose.....	16
1.4 Caspasen sind der Motor der Apoptose.....	17
1.5 Der extrinsische Signalweg der Apoptose .....	18
1.6 Das anti-apoptische Protein FLIP (FLICE inhibierendes Protein) .....	21
1.7 Der intrinsische Signalweg der Apoptose .....	23
1.8 Das anti-apoptotische Protein XIAP („X-linked inhibitor of apoptosis“ )	24
1.9 Tumorselektivität von TRAIL.....	26
1.10 Die UVB-induzierte Apoptose .....	27
1.11 Rapamycin induzierte Apoptose .....	29
1.12 Die Rolle von NF- $\kappa$ B .....	29
1.13 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	31
<b>II. Materialien .....</b>	<b>33</b>
<b>III. Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.1 Kultivierung von Melanozyten und Melanomzelllinien.....	39
3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	40
3.3 Stimulation der Zellen .....	40
3.4 Gewinnung der Proteinextrakte .....	40
3.5 Photometrische Proteinbestimmung .....	41
3.6 SDS-PAGE .....	41
3.7 Semi-dry Western-Blot und Immundetektion .....	41
3.8 Apoptosebestimmung mittels <i>Cell Death Detection</i> ELISA.....	42
3.9 Caspase-Aktivitätstest .....	42
3.10 m-RNA Isolation.....	42
3.11 RT- PCR Analysen.....	43
3.12 Transfektion durch Elektroporation .....	44

3.13	Transfektion mit Lipofectamin 2000 .....	45
3.14	Durchflusszytometrie .....	45
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1	Apoptoseverhalten von Melanozyten und Melanomzellen .....	46
4.1.1	Apoptoserate von Melanozyten nach Stimulation mit TRAIL, UVB sowie Kostimulation mit TRAIL und UVB .....	46
4.1.2	TRAIL induzierte Apoptose in Melanomzelllinien .....	47
4.1.3	Sensitivierung der Melanomzelllinien gegenüber TRAIL durch Bestrahlung mit einer sublethalen UVB-Dosis .....	49
4.1.4	Suszeptibilität der Melanomzelllinien gegenüber dem Todesliganden FAS .....	52
4.1.5	Führt Kostimulation mit dem Immunsuppressivum Rapamycin ebenfalls zur Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose in Melanomzelllinien? .....	55
4.2	Die TRAIL-Rezeptorexpression .....	57
4.2.1	Die TRAIL-Rezeptorexpression in TRAIL-resistenten primären Melanozyten .....	57
4.2.2	Die TRAIL-Rezeptorexpression der Melanomzelllinien .....	58
4.3.1	Das relative Expressionsprofil von Caspase-8 und FLIP <sub>Long / Short</sub> (FLIP <sub>L/S</sub> ) .....	64
4.3.2	Das relative Expressionsprofil von Caspase-3 und XIAP .....	67
4.4	Die Rolle von Caspase-8 und FLIP <sub>L</sub> in TRAIL-resistenten Melanomzellen .....	69
4.5	Die Rolle von Caspase-3 und XIAP in TRAIL-resistenten Melanomzellen .....	74
4.6	Die transkriptionelle Regulation von XIAP und FLIP .....	79
4.6.1	Einfluss der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung, respektive NF- $\kappa$ B-Aktivierung, auf die Expression von XIAP und FLIP .....	79
4.7	Die Beteiligung des intrinsischen Signalweges an der TRAIL-induzierten Apoptose und deren UVB-induzierten Verstärkung .....	83
4.7.1	Das Transkriptionsmuster des pro-apoptischen Proteins Bax .....	83
4.7.2	Die Bestimmung der Caspase-9-Aktivität .....	85

---

4.8	Untersuchung des NF- $\kappa$ B-regulierten, anti-apoptotischen XIAP Proteins.....	87
4.8.1	Einfluss der XIAP-Überexpression bzw. „ <i>knock-down</i> “ auf die TRAIL-Resistenz.....	87
4.8.2	Auswirkungen der Inhibierung von I $\kappa$ B $\alpha$ .....	91
4.9	Die proteasomale Degradierung von XIAP .....	93
<b>V.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
<b>VI.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>VII.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>VIII.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>IX.</b>	<b>Bücher und andere Hilfsmittel.....</b>	<b>124</b>
<b>X.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	Bcl-2-associated X protein (Bcl-2 Homolog)
Bcl-2	B cell cll/lymphoma 2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIR	baculovirus IAP repeats
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CARD	Caspase-Aktivierung-Rekrutierungsdomänen
cDNA	copy DNA
ciAP	cellular inhibitor of apoptosis
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-Glykol-Tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas adaptor protein with death domain
Fas	Fibroblast assoziierter Rezeptor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FLIP	FLICE inhibitory protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HM	hoch aggressives Melanom
HRP	Meerrettichperoxidase (Horse Radish Peroxidase)
IAP	inhibitor of apoptosis protein



---

ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
min.	Minuten
MM	metastatisches Melanom
MOPS	3-(4-Morpholino-) propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of Rapamycin
NER	nucleotide excision repair
NLS	Kernlokalisierungssequenz
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
RGP	radiale Wachstumsphase
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Smac	second mitochondrial-derived activator caspase
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis ligand
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGP	vertikale Wachstumsphase
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
zDEVD	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone
zIETD	FMK Z-IIE-Glu(OMe)Thr-Asp(OMe)- fluoromethylketone
zQVD	Q-Val-Asp-(non-Ome)-PPh

## Zusammenfassung

Die Tatsache, dass sich viele maligne Melanome resistent gegenüber dem tumorselektiven Liganden TRAIL (tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand) verhalten, erfordert erweiterte Ansätze in der Melanomtherapie. Durch die Untersuchungen, die mit 18 unterschiedlichen Melanomzelllinien durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die TRAIL-Suszeptibilität unabhängig vom jeweiligen Tumorprogressionsstadium ist, und dass die Kostimulation mit einer sublethalen UVB-Dosis ubiquitär eine stark synergistisch sensibilisierende Auswirkung auf die TRAIL-resistenten Melanomzellen hat. Es zeigte sich hierbei, dass das TRAIL-Rezeptorexpressionsmuster (Agonisten versus Antagonisten) nicht ausschlaggebend für das Apoptoseverhalten der Melanomzellen ist. Vielmehr scheinen intrazelluläre Mechanismen für die unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber TRAIL verantwortlich zu sein. Intrazelluläre Studien zeigten schließlich, dass die grundsätzliche TRAIL-Sensitivität durch Caspase-8-Spaltung und -Aktivität determiniert wird. Die UVB-induzierte Sensitivierung resistenter Zellen hingegen wird auf dem Niveau von Caspase-3 und XIAP entschieden. So geht die UVB-induzierte Sensitivierung mit einer verstärkten XIAP-Depletion und vollständiger Caspase-3-Prozessierung vom 21 kD Fragment in das katalytisch aktive 17 kD Fragment sowie dessen Aktivierung einher. Parallel zur XIAP-Depletion zeigte sich eine ebenfalls deutlich zunehmende Degradierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$ . Da NF- $\kappa$ B ein Transkriptionsfaktor ist, der durch die Aufregulierung anti-apoptotischer Gene wie XIAP Apoptoseresistenz vermittelt, könnte so der TRAIL-induzierten Apoptose entgegengewirkt werden. Andererseits ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B in Anwesenheit von DNA-schädigenden Agenzien seine Eigenschaften an selektiven Promotoren ändert und so von einem Aktivator in einen Repressor dieser Gene konvertiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine NF- $\kappa$ B-Freisetzung nach TRAIL und UVB-Kostimulation zu einer transkriptionellen Repression u.a. des XIAP-Gens führt und damit maßgeblich zu dessen zytosolischer Depletion und der Sensitivierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose beiträgt. Die Schlüsselrolle von XIAP in der Suszeptibilität von Melanomzellen gegenüber TRAIL konnte durch Überexpressions- und „*knock down*“- Versuche von XIAP eindeutig bestätigt werden. Durch Überexpression einer I $\kappa$ B $\alpha$  Superrepressorvariante konnte schließlich die Abhängigkeit der XIAP-Depletion und der Apoptose-Sensitivität von NF $\kappa$ B bestätigt werden. XIAP scheint also die entscheidende

Rolle bei der Vermittlung der TRAIL-Resistenz in allen hier untersuchten Melanomzelllinien zu spielen. Die Entschlüsselung dieses ubiquitären, molekularen Sensitivierungsmechanismus durch Kombinationstherapie mit UVB zeigt neue Möglichkeiten wie die TRAIL-Resistenz im Melanomsystem durchbrochen werden kann und bietet somit die Basis für neue Therapieansätze zur erfolgreichen Bekämpfung des malignen Melanoms.

## Abstract

The fact that a lot of malignant melanoma are resistant against the tumor-selective death ligand TRAIL (tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand) required an extension of approaches in the development of successful melanoma therapies. By analysing 18 melanoma cell lines it could be shown that TRAIL susceptibility is completely independent of the tumor progression stage, and that co-exposure to a sublethal ultraviolet B (UVB) light dose ubiquitously induces a strong synergistic, sensitization to TRAIL of initially resistant melanoma cells. In this context the TRAIL-receptor expression pattern (agonist versus antagonist) proved to be not crucial regarding the apoptotic behaviour of melanoma cells. In fact intracellular mechanisms appeared to be rather responsible for the different TRAIL susceptibility. Finally intracellular studies pointed out that the basic TRAIL sensitivity is determined by caspase-8 cleavage and activity. However, the UVB-induced sensitization of TRAIL resistant cell lines is determined at the level of caspase-3 and XIAP. The UVB induced sensitization coincides with enhanced XIAP depletion and complete caspase-3 processing from the p21 fragment into the catalytically active p17 fragment as well as its activation. In parallel to the XIAP depletion a significantly increasing degradation of the NF- $\kappa$ B-inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  also occurred. Due to the fact that NF- $\kappa$ B is a transcription factor which mediates apoptosis resistance by upregulation of antiapoptotic genes like XIAP, it may therefore counteract TRAIL induced apoptosis. On the other hand it is known that NF- $\kappa$ B changes its characteristics at selective promoters in presence of DNA damaging agents and so converts from an activator into a repressor of these genes. The present thesis confirms that NF- $\kappa$ B release after TRAIL und UVB costimulation leads to transcriptional repression of the XIAP gen and so significantly contributes to its cytosolic depletion and sensitization against TRAIL induced apoptosis. The major role of XIAP in determining TRAIL susceptibility of melanoma cell lines could be univocally confirmed by XIAP overexpression and „knock down,, experiments. Finally the dependence of XIAP depletion and apoptosis sensitization via NF- $\kappa$ B could be confirmed by overexpression of a I $\kappa$ B $\alpha$  superrepressor variant. XIAP plays a crucial role in the mediation of TRAIL resistance in all melanoma cell lines which have been analysed in this study. The decoding of this ubiquitous molecular mechanism of sensitization by UVB in combination therapy offers new possibilities how TRAIL resistance in the

melanoma system can be overcome and provides the basis for new therapeutic approaches for a successful combat of malignant melanoma.

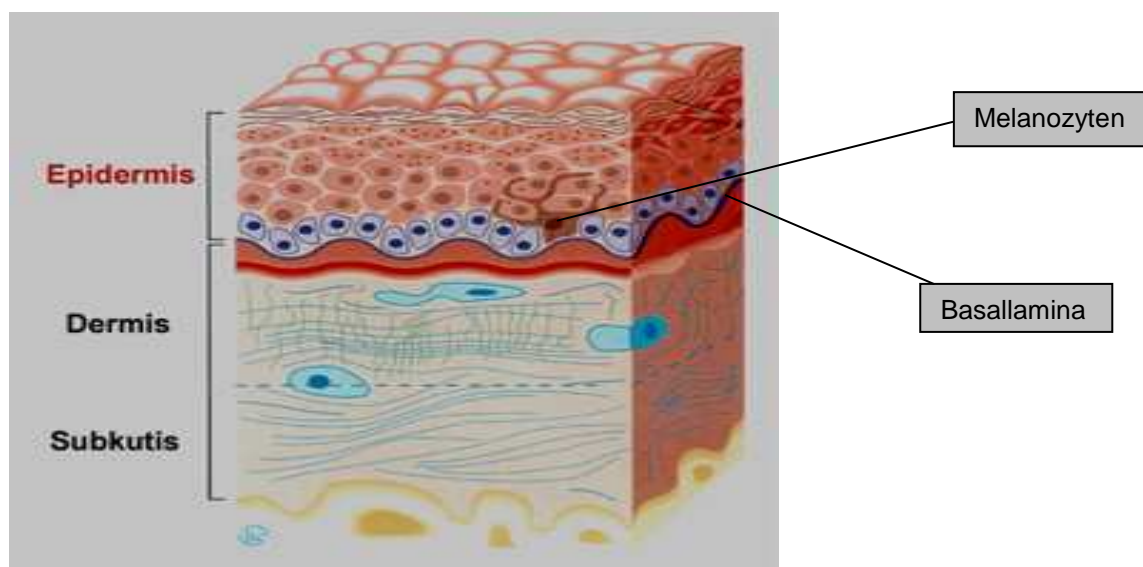
## I. Einleitung

### 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die äußere Haut gliedert sich in drei Hauptschichten:

- Oberhaut (Epidermis)
- Lederhaut (Dermis oder Corium)
- Unterhaut (Subcutis)

Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, den eigentlichen Epidermiszellen. Die Melanozyten sind die Pigmentzellen der Haut und liegen auf der Basallamina der Epidermis auf. Die Hauptaufgabe der Melanozyten besteht in der Versorgung der Keratinozyten mit Melanosomen und dem darin enthaltenen Pigment Melanin. Der Transfer der Melanosomen zu den epidermalen Keratinozyten findet über die sogenannte Pigmentierungseinheit (ein Melanozyt pro 36 Keratinozyten) statt. Durch Phagozytose nehmen die Keratinozyten die Melanosomen auf (Fritsch, 2004). Das freigesetzte Melanin legt sich zum Schutz der DNA um die Zellkerne und schützt so vor DNA-Schädigungen, die durch UV-Strahlung verursacht werden können (Hsu et al., 2002).



**Abbildung 1.1:** Aufbau der Haut: Die Haut besteht aus drei Schichten: der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Corium, Dermis) und der Unterhaut (Subkutis). Die Pigmentzellen (Melanozyten) der Haut liegen auf der Basallamina der Epidermis ([www.obagi.no/.../hudblokk-epidermis.jpg](http://www.obagi.no/.../hudblokk-epidermis.jpg)).

## 1.2 Das Melanom

Das **Melanom**, auch **schwarzer Hautkrebs** genannt, ist eine hochgradig bösartige (maligne) Entartung der Melanozyten. Das maligne Melanom der Haut ist besonders durch seine hohe Mortalität charakterisiert, sowie durch eine gestiegene Inzidenz in den letzten Dekaden (Jung, 1995). Der Tumor neigt dazu, früh Metastasen über Lymph- und Blutbahnen zu streuen und gilt daher als äußerst gefährlich. Von großer Bedeutung ist neben dem hohen metastatischen Potenzial auch die Apoptoseresistenz. Diese führt sowohl zu einer verminderten Erkennung der Krebszellen durch das Immunsystem, als auch zur Ineffizienz von Chemotherapeutika. Neue therapeutische Strategien werden daher benötigt, um die schlechte Prognose des malignen Melanoms zu verbessern.

### 1.2.1 Melanom-Progression

Die regelmäßige Sonnenbestrahlung der Haut gilt als eine der Hauptursachen für die Entstehung von Hautkrebs. Während der Tumorentwicklung entzieht sich die Zelle der lokalen Wachstumskontrolle und den Apoptosesignalen, sie verändert ihr Mobilitäts- und Adhäsionsverhalten und entwickelt neue Eigenschaften hinsichtlich Matrixdegradierung und Immunabwehr. Diese Veränderungen sind mit Defekten in der Signaltransduktion, der Zellzykluskontrolle und der Deregulation von Wachstumsfaktoren verbunden.

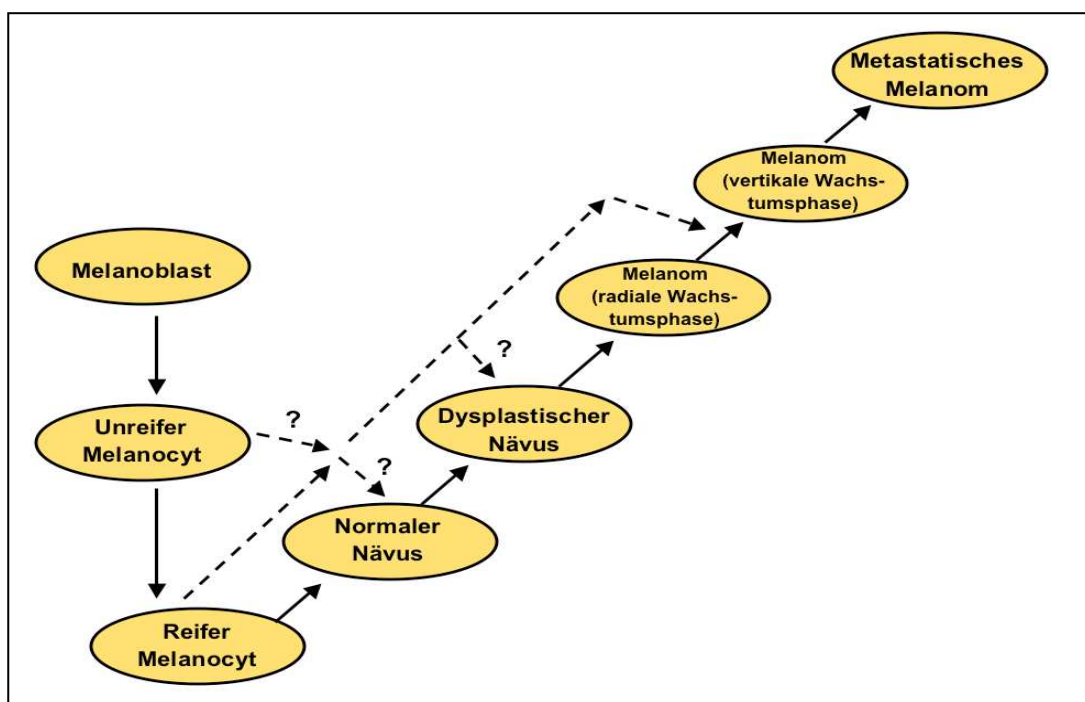
Die Progression vom Melanozyt zum malignen Melanom verläuft über fünf definierte Stadien (Clark, 1991; Elder et al., 1993).

1. Als früheste, hyperplastische Läsion von Melanozyten wird der **melanozytäre Nävus** angesehen. Dieser differenziert selten spontan aus (Schwannsche Differenzierung), kann aber auch manchmal entarten.
2. So kann sich aus einem angeborenen oder erworbenen Nävus mit strukturell normalen Melanozyten zunächst ein **dysplastischer Nävus** mit strukturellen Atypien entwickeln. Dieser ist ein potentieller Vorläufer von Melanomen.
3. Die früheste Phase der Melanomentwicklung ist durch ein langsames Wachstum in radialer Richtung gekennzeichnet und wird daher auch als frühe **radiale**

**Wachstumsphase (RGP)** bezeichnet. Diese Melanome zeigen noch kein invasives Tumorwachstum und auch keine Metastasenbildung (Hsu et al., 2002).

4. Erst in der nächsten Stufe, der **vertikalen Wachstumsphase (VGP)**, durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran und gelangen in die Dermis und das subkutane Gewebe. Somit sind sie zum invasiven Tumorwachstum und zur Metastasenbildung fähig. Außerdem treten hier genetisch und funktionell veränderte Populationen auf.

5. Das **metastasierende Melanom (MM)** kann über Blut- und Lymphbahnen auch entfernte Organe befallen (Meier et al., 1998), dies jedoch ohne weitere genetische Veränderungen. Die Metastase bildet schließlich die letzte Stufe der Tumorprogression: einzelne Zellen haben sich abgesiedelt und in entfernten Geweben einen zweiten Krankheitsherd gebildet.



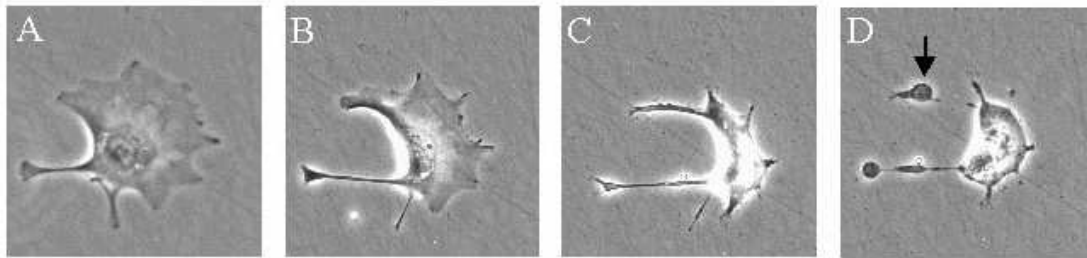
**Abbildung 1.2:** Übersicht über die Melanom-Progressionsstadien (Meier et al., 1998).

### 1.3 Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man die Eliminierung bestimmter Zellen durch den programmierten Zelltod. Zuerst schrumpfen die Zellen, das Chromatin kondensiert und die Zelle fängt an, Membranausstülpungen zu bilden (*membrane blebbing*), die sich



schließlich in Form von apoptotic bodies von der Zelle abschnüren. Anschließend werden sie von Makrophagen phagozytiert (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980) und verhindern so die Schädigung des Nachbargewebes (Fiers et al., 1999).



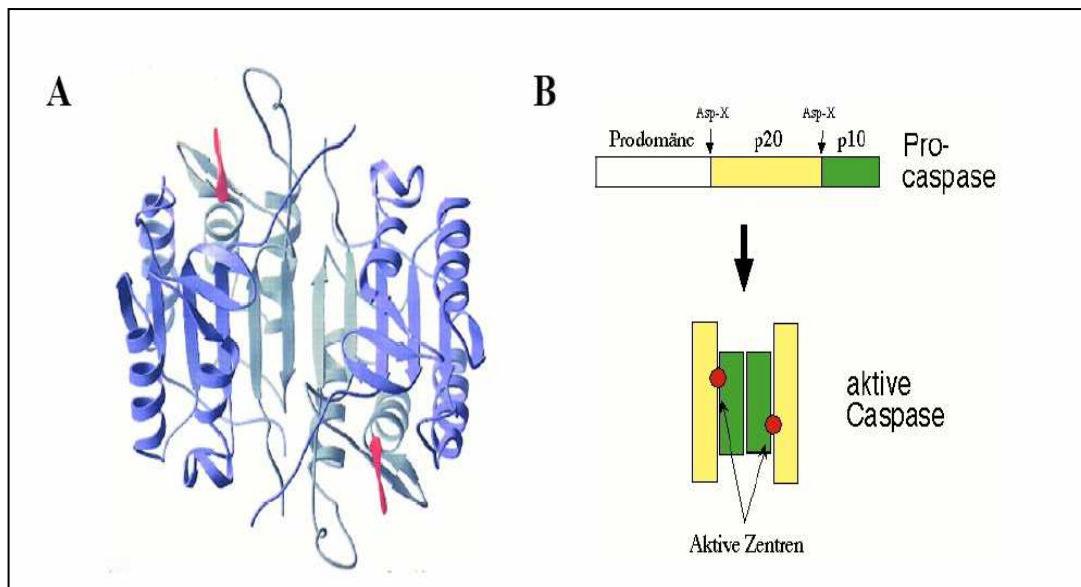
**Abbildung 1.3:** Morphologische Veränderungen während der Apoptose **A:** Zellschrumpfung **B:** Chromatin Kondensation und Membranausstülpung **C:** Abschnürung der apoptotic bodies **D:** Phagozytose ([www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash](http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash))

Nur wenn die Neubildung und die Eliminierung der Zellen im Gleichgewicht stehen, bleibt der Organismus intakt. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, sind krankhafte Erscheinungen die Folge, da die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase, bei der Embryonalentwicklung, der Neurodegeneration und der Krebsentstehung spielt (Cohen, 1991; Kerr et al., 1994; Jacobson et al., 1997). Apoptose kann u.a. durch Zytokine, UV-Strahlung, freie Radikale und durch Entzug von Wachstumsfaktoren induziert werden (Peter & Krammer, 1998; Nunez et al., 1990; Wesselborg et al., 1999).

#### 1.4 Caspasen sind der Motor der Apoptose

Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose auslösenden Wege ist die Aktivierung von Cystein Aspartat-spezifischen Proteasen, den sogenannten Caspasen (Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000; Nunez et al., 1998). Caspasen werden konstitutiv als Pro-Enzyme (Zymogene) im Zytoplasma synthetisiert. Die Zymogene bestehen aus drei Untereinheiten: einer N-terminalen Prodomäne, sowie einer großen (ca. 20 kD) und einer kleinen (ca. 10 kD) Untereinheit, welche durch eine Linker-Region getrennt sind. Caspasen werden proteolytisch prozessiert, um ein aktives Heterotetramer zu bilden, bestehend aus je zwei 20 kD/10 kD Heterodimeren mit einem katalytischen Zentrum. Es wird zwischen zwei Caspase-Arten unterschieden: Initiator- und Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen, wie Caspase-8 und -9, besitzen eine lange Prodomäne, die es ihnen ermöglicht, mit den Todeseffektordomänen (DED) bzw. den Caspase-Aktivierung-Rekrutierungsdomänen (CARD) ihrer entsprechenden

Adapterproteine zu interagieren. Die Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6 und -7, besitzen dagegen eine kurze Prodomäne (Cohen, 1997). Die Effektorcaspasen werden von den Initiatorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert (Stennicke & Salvesen 2000).



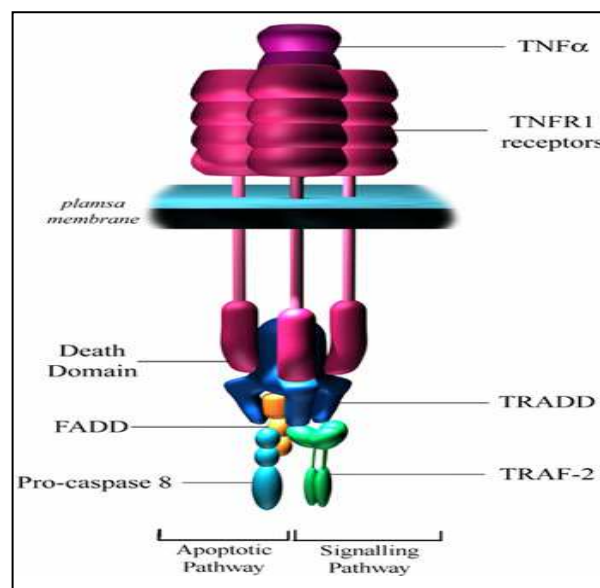
**Abbildung 1.4:** Caspase-Prozessierung: Zuerst wird die Prodomäne der Pro-Caspase abgespalten. Eine nachfolgende Spaltung der großen Untereinheit von der kleinen führt zur einem aktiven Heterotetramer mit 2 katalytisch aktiven Zentren (Haier).

Die Aktivierung von Effektorcaspasen resultiert in der Spaltung von sogenannten Todessubstraten und führt schließlich zur DNA-Fragmentierung (Scaffidi et al., 1998). Zu diesen Todessubstraten gehören Enzyme und Proteine, die für das Überleben der Zellen essentiell sind. Durch die Spaltung von Substraten, wie z.B. PARP-1, kommt es zur Inhibierung der DNA-Reparatur (Nicholson et al., 1995). Auch Apoptoseinhibitoren wie die Bcl-2-Proteine oder der Caspase-8-Inhibitor c-FLIP werden durch Caspasen gespalten (Irmeler et al., 1997). Caspasen können über den extrinsischen Todesrezeptorsignalweg und über den intrinsischen Stimulus aktiviert werden.

### 1.5 Der extrinsische Signalweg der Apoptose

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren ausgelöst. Charakteristisch für die Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNF-R, TRAIL-R, Fas/CD95) ist das Vorhandensein einer homologen cysteinreichen extrazellulären Domäne, sowie einer zytoplasmatischen

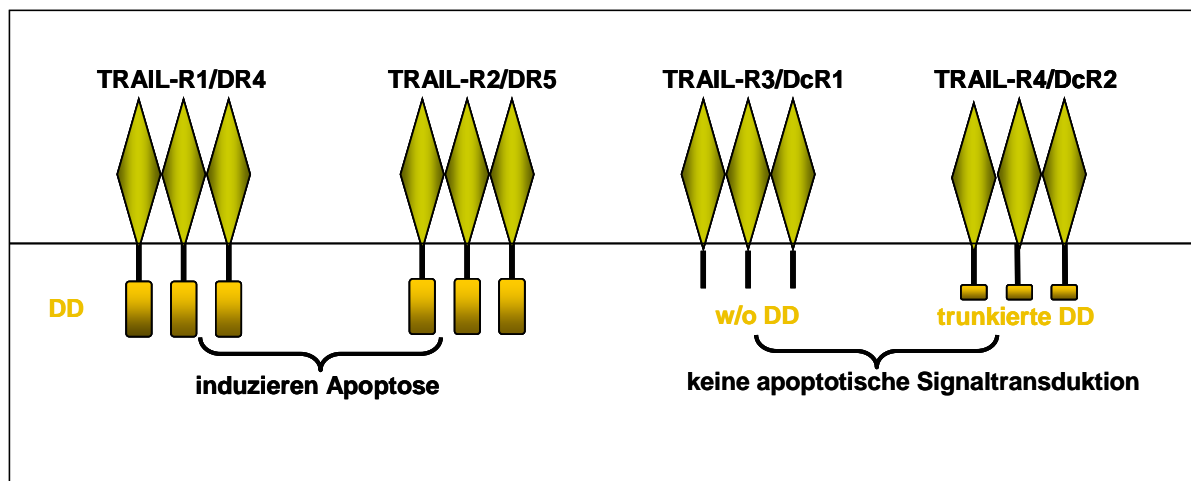
Todesdomäne (DD) (Ashkenazi et al., 1998). Die Bindung homotrimerer Liganden TNF $\alpha$ , TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) und Fas Liganden (FasL) (Leong & Karsan, 2000) an die entsprechenden Rezeptoren führt zu deren Trimerisierung und damit zur Aktivierung der intrazellulären DD (Peter ME & Krammer, 2000; Peter ME & Krammer, 2003). Dadurch wird die Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) zur DD des Rezeptors vermittelt (Kischkel et al., 1995). FADD besitzt neben der DD auch eine Todeseffektordomäne (DED), über die dann die Procaspase-8 rekrutiert und unter Ausbildung des todesinduzierenden Komplexes (death inducing signaling complex, DISC) autokatalytisch aktiviert wird (Kischkel et al., 1995). Durch eine signalverstärkende Rückkopplung werden weitere Caspase-8-Moleküle aktiviert, die im Folgenden durch die weitere proteolytische Prozessierung von Effektorcaspasen, z.B. Caspase-3 und Caspase-7, letztendlich zur Vollstreckung des programmierten Zelltodes führen (Scaffidi et al., 1998). Der extrinsische Signalweg kann zusätzlich durch Zuschaltung des intrinsischen Amplifikationsloops verstärkt werden.



**Abbildung 1.5.1:** TNF-Rezeptor Aktivierung: Nach Bindung des homotrimeren Liganden (TNF $\alpha$ ) an den Todesrezeptor bildet sich der DISC aus. Er besteht aus dem Adaptermolekül FADD, welches an die DD rekrutiert wird und der Procaspase-8, welche an die „death effector domain“ (DED) von FADD bindet. Dies führt zur Aktivierung der Procaspase-8, die wiederum die Effektor-Caspasen aktiviert welche schließlich die Apoptose induzieren ([www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash](http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash)).

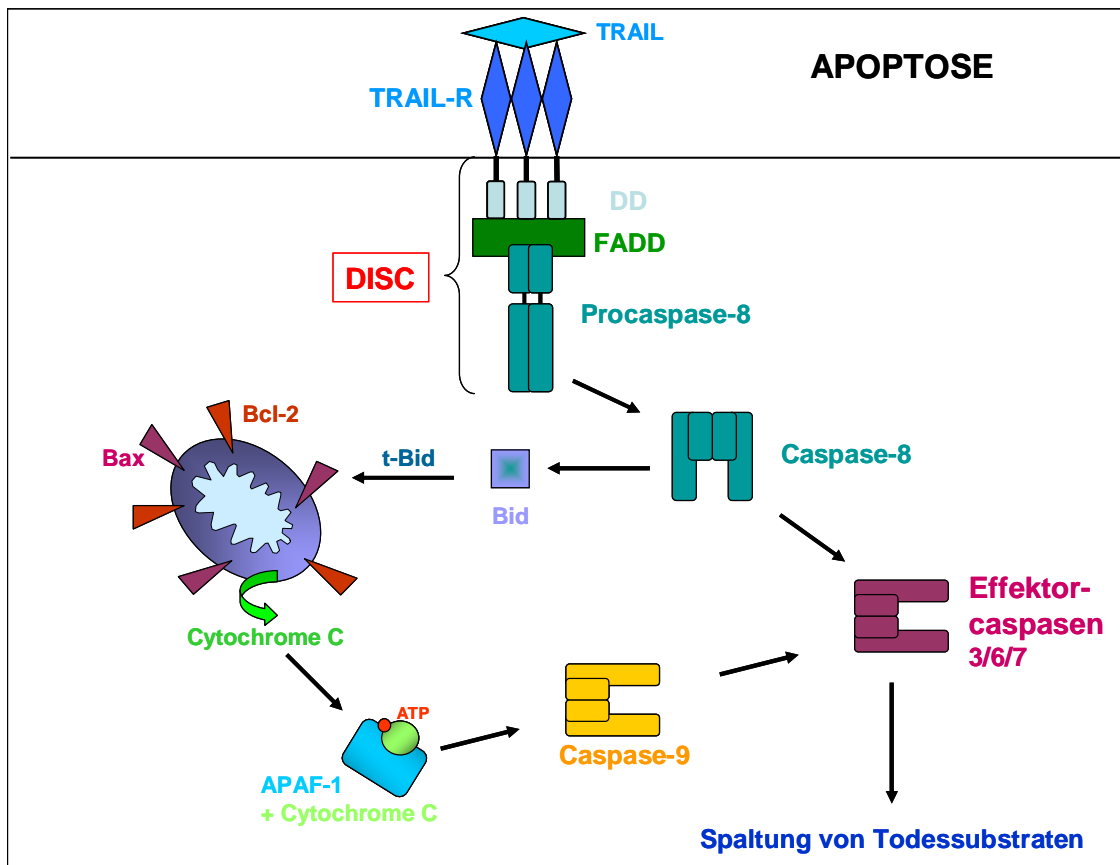
Unter den Liganden zählt TRAIL zu den potentesten Induktoren der rezeptorvermittelten Apoptose. Neben der membranständigen Form existiert eine durch enzymatische Spaltung entstehende, lösliche Form (Mariani & Krammer, 1998). TRAIL kann an vier

unterschiedliche TRAIL-Rezeptoren binden, von denen nur die Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2 das Rezeptor-vermittelte, apoptotische Signal weiterleiten können (LeBlanc & Ashkenazi, 2003). TRAIL-R1 kann sowohl durch membrangebundenes, als auch durch lösliches TRAIL aktiviert werden. TRAIL-R2 hingegen benötigt zur Aktivierung membrangebundenes TRAIL oder den löslichen, durch vorheriges cross-linking mit einem Antikörper quervernetzten Liganden (Wajant et al., 2001). Dem gegenüber stehen die antagonistischen Köderrezeptoren TRAIL-R3 und -R4. TRAIL-R3 fehlt die zur Umwandlung des apoptotischen Signals notwendige, intrazelluläre DD (Degli-Esposti et al., 1997a; MacFarlane et al., 1997; Sheridan et al., 1997). TRAIL-R4 besitzt nur eine trunkeerte, intrazelluläre Todesdomäne (Marsters et al., 1997), so dass kein funktioneller DISC ausgebildet werden kann.



**Abbildung 1.5.2:** TRAIL-Rezeptor-Familie: Die Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2 besitzen die DD, dem dritten Rezeptor TRAIL-R3 fehlt die ganze und dem Rezeptor TRAIL-R4 ein Teil der intrazellulären DD.

Die Annahme, dass die Köderrezeptoren die Inhibierung der TRAIL-vermittelten Apoptose induzieren und damit Tumorselektivität vermitteln (Degli-Esposti et al., 1997a; MacFarlane et al., 1997; Sheridan et al., 1997), konnte widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass Zellen, auf deren Oberfläche die Köderrezeptoren stark exprimiert wurden, trotzdem sensitiv gegenüber TRAIL sind (Griffith et al., 1998b). Auch weitere Studien mit spezifischen Antikörpern gegen die unterschiedlichen TRAIL-Rezeptoren konnten keine Korrelation zwischen der TRAIL-Resistenz von Zelllinien und der Köderrezeptor-Expression herstellen (Walczak & Krammer, 2000). Zusätzlich wurde auch postuliert, dass die TRAIL-Sensitivität mit der TRAIL-R1/DR4-Expression zusammenhängt (Kurbanov et al., 2005).

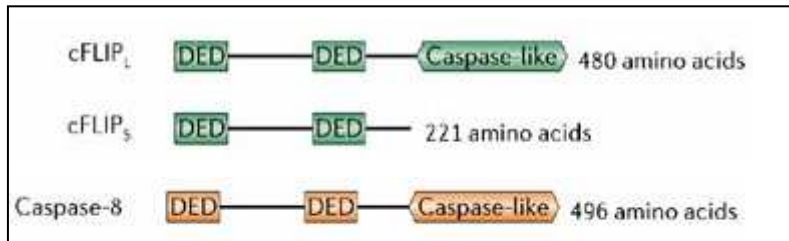


**Abbildung 1.5.3:** TRAIL vermittelte Apoptose: Bindung des Liganden löst Trimerisierung der Rezeptoren aus. Nach Bildung des DISC kommt es zur Caspase-8-Aktivierung. Die aktivierte Caspase-8 kann Effektorcaspasen aktivieren oder Bid zu tBid spalten. Das trunkierte Bid kann die Apoptose über den intrinsischen Signalweg auslösen, indem es die Apoptose durch Vermittlung der mitochondrialen Disfunktion auslöst.

## 1.6 Das anti-apoptische Protein FLIP (FLICE inhibierendes Protein)

Unter physiologischen Bedingungen stehen pro- und anti-apoptotische Proteine im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht kann durch Tumorerkrankungen gestört werden. Die anti-apoptotischen Proteine FLIP und die Proteine der IAP-Familie wie c-IAP1, c-IAP2 und XIAP, inhibieren selektiv die Caspaseaktivierung (Roy et al., 1997) und vermitteln somit die TRAIL-Resistenz (Geserick et al., 2007; Ricci et al., 2004; Zeise et al., 2004; Panner et al., 2005;). Es existieren zwei Spleißing-Varianten von c-FLIP. Die lange Form FLIP<sub>L</sub> (55 kD) und die kurze Form FLIP<sub>S</sub> (27 kD). c-FLIP inhibiert die Caspase-8 und damit die Rezeptor-induzierte Apoptose (Nagata, 1997). Diese Inhibierung kommt durch die große Sequenzhomologie von FLIP zur Caspase-8 (Hu et al., 1997) zustande. Durch diese Strukturähnlichkeit konkurrieren beide um die Bindung an das Adapterprotein FADD. Durch die Interaktion von FLIP mit FADD wird die Rekrutierung der Caspase-8 an den DISC verhindert (Hu et al., 1997; Kirchhoff et al.,

2000; Scaffidi et al., 1999; Thome et al., 1997). c-FLIP kann aber auch direkt mit der Procaspase-8 heterodimerisieren und sie dadurch inhibieren (Boldin et al., 1996; Irmeler et al., 1997; Tschopp et al., 1998). Die kurze Isoform FLIP<sub>S</sub> verhindert vollständig die Autoprozessierung, und durch FLIP<sub>L</sub> ist zwar die Abspaltung von p10 möglich, aber die weitere Prozessierung der Caspase-8 wird verhindert (Krueger et al., 2001a, b).

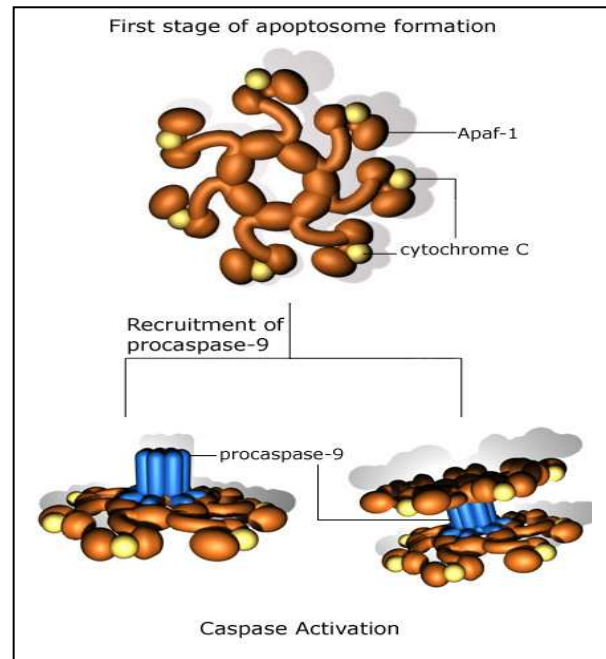


**Abbildung 1.6:** Sequenzhomologie von FLIP zur Caspase-8: FLIP<sub>L</sub> und Caspase-8 weisen Strukturähnlichkeiten auf: beide besitzen zwei „death effector“ Domänen (DED) im N-terminalen Bereich und eine Caspase-8-Homologie-Domäne im C-Terminus. Trotz ihrer Homologie besitzt FLIP<sub>L</sub> keine Caspase-Aktivität (Hu et al., 1997). Im Gegensatz zu FLIP<sub>L</sub> besitzt FLIP<sub>S</sub> keine Caspase-Homologie-Domäne (Tschopp et al., 1998) ([www.nature.com/.../v6/n3/fig\\_tab/nri1787\\_F2.html](http://www.nature.com/.../v6/n3/fig_tab/nri1787_F2.html)).

Über die Funktion von c-FLIP gibt es gegensätzliche Aussagen. Dessen Einfluss auf die Regulation der rezeptorvermittelten Aktivierung von Caspase-8 kann sowohl inhibitorisch als auch aktivierend sein (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002). Eine selektive Herunterregulierung von FLIP<sub>L</sub> und FLIP<sub>S</sub> mittels RNA Interferenz (Sharp et al., 2005) zeigte, dass in diesen Zellen mehr Procaspase-8 an den DISC rekrutiert, prozessiert und aktiviert wird. Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass eine Korrelation zwischen der Expression von FLIP und der TRAIL-Resistenz existiert (Irmeler et al., 1997, Griffith et al., 1998a). Andere widersprechen dieser Behauptung. Obwohl FLIP ein anti-apoptotisches Protein ist, gibt es auch Studien, die zeigen, dass die Expression von FLIP in Melanomzelllinien nicht immer mit der TRAIL-Resistenz korreliert (Zhang et al., 1999). Aber eine Herunterregulierung von FLIP mittels siRNA sensibilisiert resistente Melanomzelllinien gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose (Chawla-Sarkar et al., 2004). Es handelt sich also nicht eindeutig um einen potenten Resistenzfaktor. Allerdings führt eine Herunterregulierung dieses Proteins immer zu einer verstärkten Apoptose. Diese Tatsache macht man sich in der Melanomtherapie zunutze. Das weit verbreitete Medikament Taxol induziert unter anderem Herunterregulierung von FLIP (Safa AR et al., 2008) und wirkt somit der Tumorgenese entgegen.

## **1.7 Der intrinsische Signalweg der Apoptose**

Der intrinsische Signalweg wird typischerweise durch chemotherapeutische Arzneimittel, ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, zellulären Stress oder den Entzug von Wachstumsfaktoren induziert, kann aber auch alternativ der Aktivierung des extrinsischen Signalweges nachgeschaltet sein (Green & Reed, 1998). Dabei aktiviert Caspase-8 Bid, welches zu den pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie gehört. Das trunkierte Bid (tBid) transloziert an die Mitochondrienmembran, wo es durch Aggregation mit Bax oder Bak die Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Faktoren, wie Smac/DIABLO, in das Zytoplasma induziert (Belizário et al., 2007; Hengartner et al., 2000). Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kann aber auch die Antwort auf bestimmte Todessignale wie UV und Zytostika sein, die bereits ohne die Beteiligung des extrinsischen Signalweges zur Freisetzung von Cytochrom C genügen (Dubrez et al., 2001; Henry et al., 2002). Durch die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht, wodurch die Proteinbindedomäne CARD von Apaf-1 zugänglich wird, so dass sie sich an die CARD Domäne der Procaspase-9 binden kann (Cain et al., 2000; Saleh et al., 1999). Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase-9 dar (Zou et al., 1997; Riedl & Guy S Salvesen, 2007). Die aktivierte Caspase-9 kann andere Caspasen wie Procaspase-3 und -7 aktivieren, die schließlich zum apoptotischen Tod der Zelle führen (Li et al., 1997; Green & Reed, 1998).



**Abbildung 1.7:** Das Apoptosom: Das Cytochrom C interagiert mit Apaf-1 und bildet unter ATP Verbrauch das Apoptosom, welches die autokatalytische Aktivierung der Procaspase-9 ermöglicht (www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash).

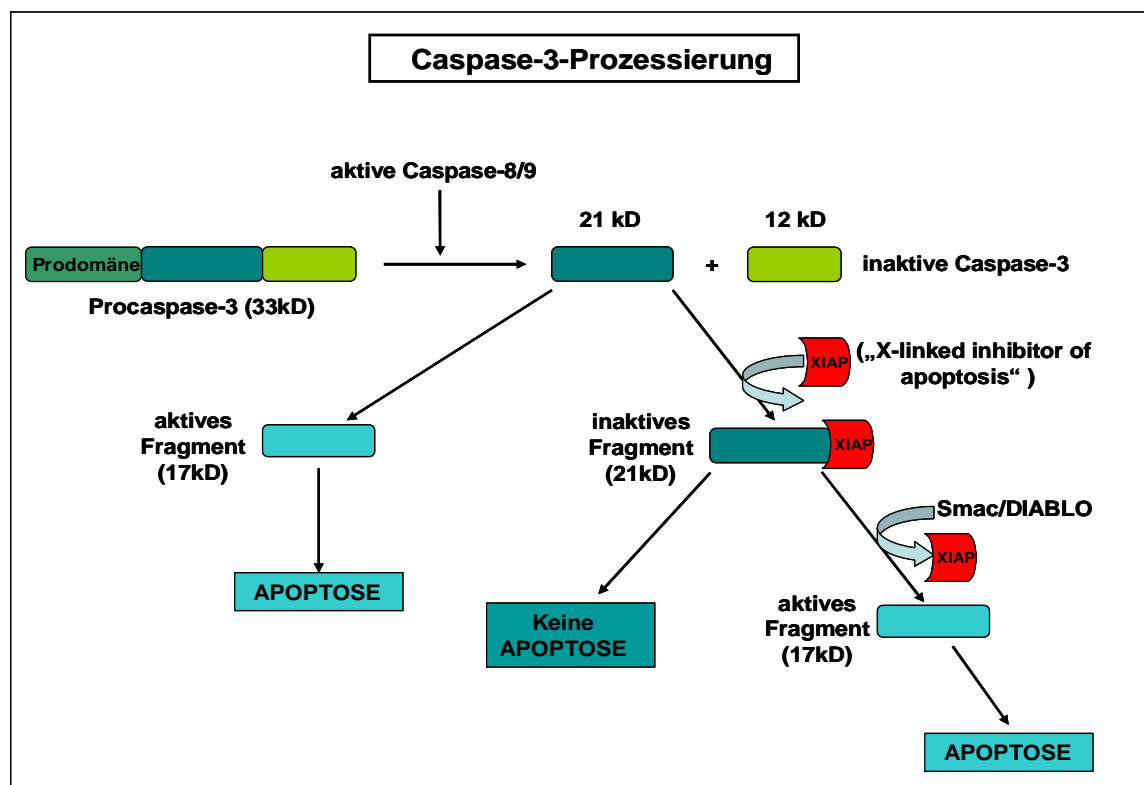
## 1.8 Das anti-apoptotische Protein XIAP („X-linked inhibitor of apoptosis“ )

Das am besten charakterisierte IAP-Molekül ist das XIAP Protein. Die Mitglieder der IAP-Familie besitzen mindestens eine BIR (baculovirus IAP repeat)-Domäne, die zuständig für ihre anti-apoptotische Aktivität ist (Deveraux et al., 1999a; Holcik & Korneluk, 2001). XIAP und c-IAP1 besitzen zudem eine RING (really interesting new gene)-Domäne, wodurch sie in der Lage sind, als Ubiquitinligasen zu agieren, d.h. sie sind für die Ubiquitinierung und anschließende Degradierung des Inhibitors und daran gebundener Caspasen verantwortlich (Silke et al., 2005, Suzuki et al., 2001a, b; Yang et al., 2000). Es wird diskutiert, ob sie neben dem proteolytischen Abbau durch die Ubiquitinierung die Funktion der Zielproteine verändern (Vaux & Silke, 2005). Zu den Zielproteinen gehören gebundene Caspasen (Huang et al., 2000; Suzuki et al., 2001a, b; Morizane et al., 2005) und der Apoptose-Regulator Smac/DIABLO (MacFarlane et al., 2002; Hu & Yang, 2003; Ma et al., 2006).

XIAP ist in seiner anti-apoptotischen Funktion sehr potent. XIAP inhibiert spezifisch die Caspasen-3, -7 und -9. Die Inhibierung wird durch unterschiedliche Bereiche des Proteins vermittelt (Takahashi et al., 1998; Deveraux et al., 1999a). Die BIR3-Domäne des XIAP bindet direkt C-terminal an die Linker-Sequenz der kleinen Untereinheit der



Caspase-9 (Liston et al., 2001; Srinivasula et al., 2001). Die Caspasen-3 und -7 werden N-terminal von der BIR2-Domäne gebunden (Suzuki et al., 2001a; Scott et al., 2005). XIAP ist in der Lage, aktivierte Caspase-3 zu ubiquitinieren und zu degradieren (Suzuki et al., 2001b). Die Procaspase-3 (33 kD) wird zunächst durch Caspase-8 oder Caspase-9 in zwei inaktive Fragmente gespalten, p21 und p12. Daran schließt sich die autokatalytische Spaltung an, wobei das inaktive (p21) Fragment zum katalytisch aktiven p17 Fragment prozessiert wird (Han et al., 1997). XIAP kann diese autokatalytische Spaltung verhindern, indem es das inaktive p21 Fragment bindet und somit die Caspasekaskade blockiert (Han et al., 1997; Micheau & Merino, 2004). Außerdem kann es seinen Inhibitor Smac/DIABLO, sowie Caspasen polyubiquitiniieren. Diese Polyubiquitinierung erfolgt durch die bereits erwähnte RING-Domäne von XIAP (Kashkar et al., 2003; Morizane et al., 2005; Kluger et al., 2007; Carter et al., 2005). Das mitochondriale Protein Smac/DIABLO kann wiederum die IAPs von den aktivierten Caspasen lösen und so den apoptotischen Prozess fördern (Du et al., 2000, Verhagen et al., 2000, Srinivasula et al., 2001).



**Abbildung 1.8:** Caspase-3-Prozessierung: Die Procaspase-3 wird zuerst in zwei inaktive Fragmente (21 kD und 12 kD) gespalten. Die nachfolgende, autokatalytische Spaltung führt zur Bildung des aktiven p17 Fragments. Das anti-apoptotische Protein XIAP verhindert die entscheidende Prozessierung des inaktiven 21kD Fragments in das aktive 17kD Fragment. Smac/DIABLO kann allerdings XIAP „neutralisieren“ und die Apoptose dadurch induzieren.

Die NF- $\kappa$ B induzierte Überexpression von XIAP steht im Zusammenhang mit der TRAIL-Resistenz in Melanomen (Zhang et al., 2001). Die Expression von XIAP ist signifikant höher in Melanomen als in benignen Proben, sowie höher in metastatischen als in primären Melanomen (Kluger et al., 2007). XIAP ist immunhistochemisch nahezu dreimal häufiger in dicken ( $> 1.0$  mm) als in dünnen ( $< 1.0$  mm) Melanomen detektierbar. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die XIAP Erhöhung mit dem Anstieg der Melanomdicke und der Tumorprogression zusammenzuhängen scheint (Emanuel et al., 2008).

Die Überexpression von IAPs spielt somit eine wichtige Rolle bei der Apoptoseresistenz von Tumorzellen. Sie inhibieren die Apoptose-Induktion durch Chemotherapeutika wie Doxorubicin (Tirro et al., 2006) und Cisplatin (Li et al., 2001) oder auch nach UVB-Bestrahlung (Grossman et al., 2001). Bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen konnte eine erhöhte Expression der anti-apoptotischen IAP-Proteine festgestellt werden (LaCasse et al., 1998; Yang et al., 2003). Dies wurde auch bei Melanomen (Vucic et al., 2000) festgestellt. Die IAPs c-IAP-1, c-IAP2 und XIAP können durch NF- $\kappa$ B aufreguliert werden (LaCasse et al., 1998).

### **1.9 Tumorselektivität von TRAIL**

TRAIL induziert die Apoptose vorwiegend in transformierten Zellen, normale Zellen werden verschont (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996; Ashkenazi et al., 1999; Kothny-Wilkes et al., 1998; Walczak et al., 1999). Die Tumorselektivität macht TRAIL besonders interessant für eine Anwendung als Krebstherapeutikum (Walczak et al., 1999). Allerdings sollten die Einflüsse der proinflammatorischen und der immunmodulatorischen Zytokine auf die Apoptose hier ebenfalls berücksichtigt werden, da Tumorzellen in vivo von Immunzellen umgeben sind, die konstant proinflammatorische Zytokine sezernieren. Dadurch könnte die tumorselektive Wirkungsweise von TRAIL beeinflusst werden. Diese Tatsache konnte in transformierten Keratinozyten durch Koinkubation mit IL-1 bereits gezeigt werden. Die TRAIL-Sensitivität von transformierten Keratinozyten wurde durch die Kostimulation mit IL-1 herabgesetzt (Kothny-Wilkes et al., 1998). Wurden die Keratinozyten allerdings mit IL-1 und UVB kostimuliert, konnte eine verstärkte UVB-induzierte Apoptose festgestellt werden (Kothny-Wilkes et al., 1999). Somit muss die Tumorselektivität von TRAIL sehr

differenziert betrachtet werden, da sich unterschiedliche Kostimulationen differenziell auf das Apoptoseverhalten auswirken können.

Entsprechend können nicht alle Tumore erfolgreich mit TRAIL therapiert werden. Auch die meisten Melanomzelllinien weisen eine hohe Resistenz gegenüber TRAIL auf. Mögliche Gründe für die Resistenz sind erniedrigte TRAIL-Rezeptor-Expressionsraten (TRAIL-R1 und TRAIL-R2), verstärkte Expression an Köderrezeptoren (TRAIL-R3 und TRAIL-R4), geringere Expressionsraten (oder Proteinmengen) wichtiger Caspasen (Caspase-3/8) oder die Überexpression anti-apoptotischer Proteine wie FLIP oder XIAP (Zeise et al., 2004; Grotzer et al., 2000; Griffith et al., 1998a; Kashkar et al., 2003). Allerdings sind chemotherapeutische Arzneimittel und ionisierende Strahlung in der Lage, resistente Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren (Kim et al., 2001; Lacour et al., 2001; Dejosez et al., 2000).

### **1.10 Die UVB-induzierte Apoptose**

Die Ultraviolette Strahlung (UV) gehört zur der energiereichsten Strahlung des sichtbaren Spektrums und kann in drei unterschiedliche Wellenlängen unterteilt werden, die UVA, UVB und UVC Strahlung. Die UVB Strahlung des mittleren Spektralbereiches (290 nm bis 320 nm) wird zu 90% von der Ozonschicht absorbiert und hat eine mittlere Eindringtiefe in die Epidermis, wodurch in erster Linie Keratinozyten und Melanozyten betroffen sind. Aufgrund seiner kürzeren Wellenlänge ist die biologische Wirksamkeit von UVB weitaus stärker als die von UVA. UVB-Strahlung kann Hautkrebs (Matsumura et al., 2004), die Suppression des Immunsystems (Beissert & Schwarz, 1999), DNA-Schäden (Kulms et al., 1999), Entzündungsprozesse und den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren (Kulms & Schwarz, 2000; Young, 1987). Die UVB-induzierte Apoptose dient also auch gleichzeitig als Schutzmechanismus, indem Zellen mit irreparablen DNA-Schaden eliminiert werden, die sonst möglicherweise entarten könnten (Kraemer, 1997). Die UVB-Strahlung kann die Apoptose über verschiedene Zellsignalwege auslösen. Einerseits intrazellulär über die Induktion von DNA-Schädigungen, andererseits über die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), aber auch über die Liganden-unabhängige Aktivierung von Todesrezeptoren (Aragane et al., 1998; Kulms et al., 1999; Kulms et al., 2002; Pourzand et al., 1999). Der UVB-induzierte DNA-Schaden ist dabei der wichtigste und entscheidende Initiator der UVB vermittelnden Apoptose (Nakajima et al., 2004). Dabei kommt es zur Bildung von

dimeren Photoprodukten zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen: Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) sowie zu [6-4]-Photoprodukten (Patrick, 1977; Kulms et al., 1999; Nakajima et al., 2004). Die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose. ROS können Biomoleküle wie DNA, Lipide und Proteine oxidieren (Lindahl, 1993). Durch die Lipidperoxidation kommt es neben Strukturveränderungen der Plasmamembran auch zu Schädigungen der inneren Mitochondrienmembran, wodurch die Cytochrom C Freisetzung ins Zytoplasma und somit die Apoptose eingeleitet wird (Liang et al., 2000; Luo et al., 1998; De Kok et al., 1994; Bongarzone et al., 1995).

Die immunsuppressive Wirkung des UVB wird bereits seit Jahren in der Medizin eingesetzt. Unter Einfluss von UVB-Licht reagieren die Zellen sensibler, so dass sie erfolgreich bei oberflächlichen Hauttumoren wie aktinischen Keratosen, Morbus Bowen, oberflächlichen Basaliomen, aber auch entzündlichen Hauterkrankungen wie Viruspapillomen oder Condylomata accuminata zum Einsatz kommen. Auch Kim et al. postulierte diese immunsuppressive Wirkung von UVB in humanen, kolorektalen Karzinomzellen, wodurch diese Zellen mit erworbener TRAIL-Resistenz durch UVB-Strahlung sensibilisiert werden konnten (Kim SC et al., 2007). In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass sublethale UVB-Dosen TRAIL-resistente Melanomzellen sensibilisieren. Außerdem konnte eine synergistisch gesteigerte Apoptose in TRAIL-sensitiven Zellen beobachtet werden (Zeise et al., 2004).

Diese sublethale UVB-Bestrahlung stellt somit eine wichtige Behandlungsmöglichkeit für Patienten dar, die an Hautkrebs erkranken. Im Vergleich zu einer Behandlung mit chemotherapeutischen Arzneimitteln oder ionisierender Strahlung sind die Nebenwirkungen der sublethalen UVB-Dosis äußerst gering. Tumorerkrankungen werden auch häufig durch Vitamin D-Mangel im Körper begünstigt. Durch UV-Licht wird der Spiegel an krebsschützendem Vitamin D erhöht, wodurch der Krebsentstehung entgegengewirkt werden kann (Moan et al., 2007). Somit sollte der Einsatz von UVB bei Tumorerkrankungen nicht mehr in Frage gestellt werden, solange die UVB Dosis in einem kontrolliert niedrigen Bereich liegt.

### **1.11 Rapamycin induzierte Apoptose**

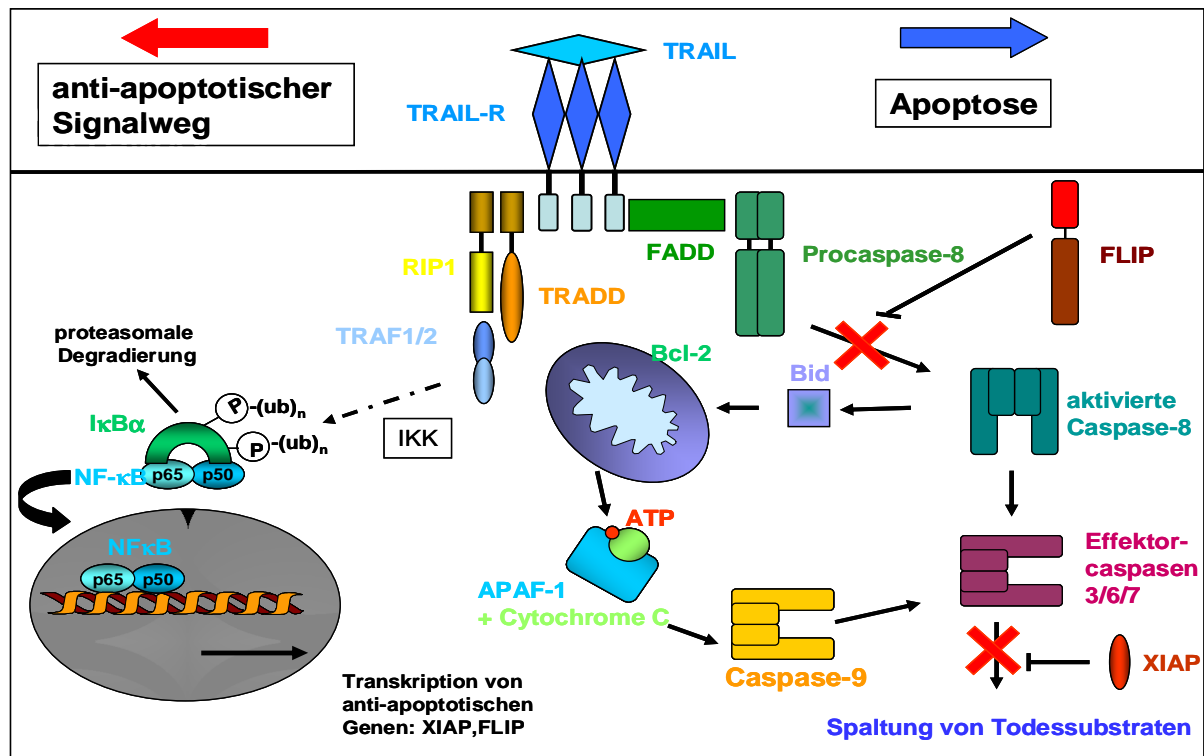
Rapamycin zählt zu den Immunsuppressiva, die erfolgreich in der Transplantationsmedizin eingesetzt werden. Rapamycin inhibiert die T-Zell-Proteinsynthese und das IL-2 vermittelte Proliferationssignal (Pfitzmann & Hummel, 2001; Sahin et al., 2004). In weiteren Studien konnte eine Hemmung des Wachstums von Primärtumoren und Metastasen festgestellt werden (Stephan et al., 2004). Rapamycin ist somit wahrscheinlich in der Lage, die Tumor-Angiogenese zu hemmen, indem es eine verminderte Freisetzung des Gefäßendothel-Wachstumsfaktors VEGF und eine direkte Inhibierung der Proliferation der Tumorzellen veranlasst (Guba et al., 2002). Rapamycin ist ein direkter Inhibitor des Transkriptionsregulators mTOR. Die Serin/Threonin Kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin) aktiviert das ribosomale Protein S6, ein direktes Substrat der p70S6K und 4EBP-1, ein Inhibitor der Proteintranslation. Aktiviertes p70S6K beschleunigt die Proteinsynthese, phosphoryliert und aktiviert das S6-Protein der ribosomalen 40s-Untereinheit, was zu einer erhöhten Translation von mRNA-Transkripten führt (Jefferies et al., 1997; Brown et al., 1995; Fingar et al., 2002; Wullschleger et al., 2006). Rapamycin hemmt mTOR und führt dadurch zu einer Herunterregulierung des anti-apoptotischen Proteins FLIP in Glioblastomazellen und folglich zu einer Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose (Panner et al., 2005).

### **1.12 Die Rolle von NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von physiologischen Prozessen reguliert. Im nicht aktivierten Zustand liegt NF- $\kappa$ B im Zytoplasma vor, gebunden an seinen Inhibitoren I $\kappa$ B $\alpha$  (Li & Verma, 2002; Baeuerle & Baltimore, 1988; Maniatis, 1997). Diese maskieren die Kernlokalisationssequenz (NLS) von NF- $\kappa$ B und verhindern dadurch, dass NF- $\kappa$ B in den Kern transloziert und dort entsprechende Zielgene aktiviert (Karin & Ben-Neriah, 2000; Baldwin et al., 1996). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann durch intra- und extrazelluläre Signale wie pro-inflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1), UV-Strahlen, Ionenstrahlung, Wachstumsfaktoren oder Chemotherapeutika erfolgen (Karin & Ben-Neriah, 2000; Pahl, 1999; Li & Stark, 2002; Huang et al., 2002). Der jeweilige Stimulus führt zur Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine durch den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK), welcher 2 spezifische Serinreste 32/36, von I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert, wodurch es für die folgende Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung markiert ist (Maniatis,

1999; Karin & Ben-Neriah, 2000; Karin M et al., 2000). Frei gewordenes NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern und induziert dort die Transkription entsprechender Gene, die zumeist der Apoptose entgegenwirken. Dazu gehören die anti-apoptotischen Gene wie FLIP, cIAPs und XIAP (Wang et al., 1998, 2002; Micheau et al., 2001). Diese Funktionalität wurde auch in Tumoren wie dem T-Zell-Lymphosarkom, Melanom und Brustkrebs festgestellt (Bakker et al., 1999; McDade et al., 1999; Sumitomo et al., 1999; Sovak et al., 1997). Aus diesem Grund konnte konstitutiv aktives NF- $\kappa$ B durch vermehrte Aufregulierung anti-apoptotischer Proteine für die Resistenzvermittlung gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht werden (Baldwin A.S., 2001). Analoge Zusammenhänge konnten auch für die Resistenz von Melanomzellen gegenüber TRAIL verantwortlich gemacht werden (Franco et al., 2001). Tatsächlich sind TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1, TRAIL-R3) in der Lage, über die Rekrutierung von TRAF-Proteinen den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zu aktivieren (Leverkus et al., 2003; Mühlenbeck et al., 2000).

Seitdem wird NF- $\kappa$ B als möglicher Repressor der Apoptose im Zusammenhang mit der Vermittlung der TRAIL-Resistenz immer öfter diskutiert (Di Pietro & Zauli, 2004; Ivanov et al., 2003; Zhang & Fang, 2005). Allerdings gibt es auch Studien, die eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B an der Apoptose vermuten lassen (Kalterschmidt et al., 2000; Kothny-Wilkes et al., 1999; Campbell et al., 2001). Die UVB-induzierte Apoptose konnte in Epithelzellen durch die Kostimulation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 NF- $\kappa$ B-abhängig verstärkt werden. Dies liegt darin begründet, dass UVB-Strahlung in Kombination mit Interleukin-1 zu einer Konvertierung von NF- $\kappa$ B von einem Induktor zu einem Repressor anti-apoptotischer Proteine führt. Dies hat eine Herunterregulierung der anti-apoptotischen Proteine wie cIAP und FLIP zur Folge, wodurch letztendlich die Apoptose verstärkt wird (Pöppelmann et al., 2005). Ob der NF- $\kappa$ B Status für die TRAIL-Resistenz bzw. die Sensitivierung TRAIL-resistenter Melanomzelllinien durch UVB-Strahlung von Bedeutung ist, ist einer der Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit.



**Abbildung 1.12:** NF-κB als Repressor der Apoptose: TRAIL kann über die Rekrutierung von TRAF-Proteinen den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren. Das aktivierte NF-κB transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription von anti-apoptotischen Genen wie XIAP und FLIP.

### 1.13 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen insgesamt 18 verschiedene, humane Melanomzelllinien aus definierten Tumorprogressionsstadien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber der TRAIL- und FAS-induzierten Apoptose charakterisiert werden. Dabei soll untersucht werden, ob die TRAIL-Sensitivität kennzeichnend für ein bestimmtes Tumorprogressionsstadium ist. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die TRAIL-Resistenz durch sublethale UVB-Bestrahlung durchbrochen werden kann. In der vorliegenden Arbeit gilt es zu erforschen, ob diese synergistische Sensitivierung einen ubiquitären Mechanismus im Melanomsystem repräsentiert, unabhängig vom Tumorprogressionsstadium. Da UVB-Strahlung *in vivo* die Tumorgenese prinzipiell ebenfalls durch seine immunsuppressive Wirkung beeinflussen kann und Rapamycin ein Immunsuppressiva ist, das eine Verstärkung der Apoptose in Tumorzellen induziert, soll ebenfalls dessen Einfluss auf die Apoptoserate der Melanomzelllinien nach der Stimulation mit TRAIL untersucht werden. Um Einblicke in die molekularen Mechanismen der stark differenziellen TRAIL-Suszeptibilität im Melanomsystem zu bekommen, wird der Zusammenhang zwischen dem

Expressionsmuster der agonistischen und antagonistischen TRAIL-Rezeptoren, das Expressionsverhältnis von pro-apoptotischen (Caspase-8, Caspase-3) und anti-apoptotischen (FLIP, XIAP) Proteinen und schließlich die Aktivierungsprofile von Initiator- und Effektorcaspasen verglichen. Der molekulare Knotenpunkt der TRAIL-Resistenzvermittlung, sowie der UVB-vermittelten, hoch synergistischen Sensitivierbarkeit, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt werden. Hierbei spielt NF- $\kappa$ B eine essentielle Rolle, da es durch differenzielle Regulation von XIAP signifikant dessen zellulären Status und damit die Sensitivität der Melanomzelle gegenüber TRAIL mitbestimmt. Es handelt sich bei dem entschlüsselten Mechanismus um ein für das Melanomsystem ubiquitären Regulationsmechanismus, der als Ansatzpunkt für die Entwicklung tumorselektiver Krebstherapien dienen kann.



## II. Materialien

Bemerkung: Die verwendeten Materialien wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

### Medium und Zusatz:

- Melanocyte Growth Medium Package ZHM-1955 (CellSystems Biotechnology GmbH)
- RPMI 1640 + L-Medium (GIBCO® Invitrogen™)
- Trypsin-EDTA (10x 5%) (GIBCO® Invitrogen™)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (GIBCO® Invitrogen™)
- Fetales Kälber Serum (PAA Laboratories GmbH)

### Inhibitoren und Stimulantien:

- iz-TRAIL (Dr. Henning Walczak "Apoptosis Regulation" German Cancer Research Center, Heidelberg)
- MG132 (Calbiochem®)
- zQVD (IMI-2309-1; Imgenex)
- Fas-Ligand (Alexis)

### Kits:

- *Cell Death Detection* ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche Diagnostics)
- ECL-Substratlösung SuperSignal® (West Dura Pierce)
- First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)
- Red-Taq™ Ready Mix™ (Sigma-Aldrich)

Protein- und DNA-Marker:

- PageRuler™ Prestained Protein (Fermentas)
- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas)

**Tabelle 2.1:** Oligonukleotide/siRNA Sequenz

Name	Sequenz (5' → 3')
hGAPDH forward	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
hGAPDH reverse	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
BIRC4 (XIAP) forward	GAAACTATCTGGGAAGCAGAG
BIRC4 (XIAP) reverse	CGAATATTAAGATTCCGGCCCA
FLIP LH-1 forward	CGAATATTAAGATTCCGGCCCA
FLIP LH-2 reverse	GAAACTATCTGGGAAGCAGAG
Bax forward	CTTCAGGGTTTCATCCAGGATC
Bax reverse	TGATGGTTCTGATCAGTTCCGG
siRNA (XIAP)	AUC CAU CCA UGG CAG AUU ATT

**Tabelle 2.2:** Plasmide

Name	Vektor	Herkunft
GFP-XIAP	pEGFP-C3	Hamid Kashkar
GFP	pEGFP-C1	Clontech
I $\kappa$ B $\alpha$ -SR	pBKCMV	Klaus Schulze-Osthoff

**Tabelle 2.3:** Primäre Antikörper

Antigen	Spezies/Klon	Hersteller	Verdünnung
$\beta$ -Aktin	Maus (AC-40)	Sigma-Aldrich	1:2000
Caspase-3	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
Caspase-8	Maus (3-1-9)	BD Pharmingen™	1:1000
I-FLICE	Kaninchen	BD Pharmingen™	1:1000
I $\kappa$ B- $\alpha$	Maus (L35A5)	Cell Signaling	1:2000
$\alpha$ -Tubulin	Maus (DM1A)	Lab Vision Corporation	1:2000

XIAP	Maus (28)	BD Pharmingen™	1:1000
TRAIL-R1	Maus (M271)	Amgen/ Genentech	1:100
TRAIL-R2	Maus (M413)	Amgen/ Genentech	1:100
TRAIL-R3	Maus (M430)	Amgen/ Genentech	1:100
TRAIL-R4	Maus (M445)	Amgen/ Genentech	1:100

Tabelle 2.4: Sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse POD-linked	Schaf	Amersham	1:2000
anti-rabbit POD-linked	Affe	Amersham	1:2000
anti-mouse FITC-linked	Maus	Sigma	1:200

Tabelle 2.5: Geräte

Name	Hersteller
Blot-Apparatur Semi-Dry Blotter Pegasus	PHASE
CO <sub>2</sub> -Inkubator 37°C und 5% CO <sub>2</sub>	varolab®
Elektrophorese-Apparatur: für Agarosegele: Sub-Cell GT DNA für Acrylamidgele: Mini-PROTEAN Tetra	BioRad
Elektroporationssystem EasyjecTPlus	peQLab
ELISA-Reader Spectra max 340 PC	Molecular Devices
Luminometer FluoStar.	BMG Lab Tech
Leitz DM IRB (Fluoreszenzmikroskop) inverses Mikroskop	Leica Olympus CKX41
Nanodrop Spectrophotometer ND-100	peQLab
PCR Robocycler® Temperature Cycler	Startogene
Photoentwicklungsapparatur X-OMAT 1000 Processor	Kodak

UVB-Röhren (TL20W/12RS)	Philips
Sonifiziergerät Sonoplus HD 200	Bandelin
Zentrifugen: 5415R	Eppendorf®
EPICS® XL-MCL Durchflusszytometer	Coulter
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM IRB

Tabelle 2.6: Puffer und Lösungen

Puffer	Ansatz
Blocking Lösung (10%)	10% (w/v) Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer
Blockierungs-Lösung 1% und 2%	Verdünnung der 10% Blockierungs-Lösung mit 0,05% TBS/Tween®-20
Blotting Puffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20% Methanol pH 8,3
DEPC-Wasser	0,1% Diethylpyrocarbonat über Nacht rühren, autoklavieren
1,5 %iges DNA-Agarosegel (120 ml)	1,8 g Agarose 120 ml 1x TAE-Puffer 2 µl Ethidiumbromid
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
PBS (10x)	26,7 mM KCl 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1379,3 mM NaCl 80,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
SDS Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3
10xTBS-Puffer	5 M NaCl <sub>2</sub> 0,2 M TRIS pH 7,5
5x TRIS/Glycin	125 mM TRIS 960 mM Glycin

Zell-Lysepuffer	<p>50 mM HEPES (pH 7,5)  150 mM NaCl  10% Glycerin  1% Triton-X-100  1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  1 mM EGTA  100 mM NaF  10 mM (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sup>4-</sup>  0,01% NaN<sub>3</sub></p> <p>Complete® Proteaseinhibitor wird der Lösung erst vor dem direkten Gebrauch zugesetzt (1:25)</p>
Lösung A	<p>50 mg LuMin.ol in  200 ml 0,1 M TRIS-HCl (pH 8,6)</p>
Lösung B	<p>11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in  10ml DMSO</p>
ECL-Lösung (frisch ansetzen)	<p>1 ml Lösung A  + 100 µl Lösung B  + 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%)</p>
GIT-Puffer	<p>4 M Guanidinthiocyanat  0,3 M NaAc  1% (v/v) N-Lauroylsarcosine  0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol  pH 4,8</p>
10x MOPS-Puffer	<p>400 mM MOPS  100 mM NaAc  10 mM EDTA  pH 7,0</p>
10x TAE-Puffer	<p>0,4 M TRIS  0,87% Eisessig  50 mM EDTA  pH 8,3</p>
6x DNA-Probenpuffer	<p>1 mM EDTA  50% Glycerol  0,025% Bromphenolblau  0,025% Xylencylol</p>
Caspase-Lyse-Puffer	<p>200 mM NaCl  20 mM Tris, pH 7.4  1% Igepal</p> <p>+ Complete® Proteaseinhibitor wird der Lösung erst vor dem direkten Gebrauch zugesetzt (1:25).</p>

Aktivitätspuffer (Caspaseaktivitätsassay)	220 mM Mannose 68 mM Saccharose 10 mM HEPES, pH 7.4 5 mM NaPO <sub>4</sub> 2 mM NaCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 mM EGTA 1 mM DTT und 0,1 mM PMSF kurz vor Gebrauch zugeben
Substratlösung (pro Probe)	75 µl Aktivitätspuffer + 0,25 µl Caspase-Substrat (20 mM) Caspase-3 Substrat: Ac-DEVD-AMC von Axxora (ALX-260-031) Caspase-8 Substrat: Ac-IETD-AMC von Axxora (ALX-260-042) Caspase-9 Substrat: Ac-LEHD-AMC von Axxora (ALX-260-080)

### III. Methoden

#### 3.1 Kultivierung von Melanozyten und Melanomzelllinien

Die Zelllinien verschiedener Tumorprogressionsstadien wurden freundlicherweise von Herr Dr. Friedegund Meier, Institut für Dermatologische Onkologie, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3.1:** Verwendete Melanomzelllinien

radiale Wachstumsphase (RGP)	vertikale Wachstumsphase (VGP)	metastatisches Melanom (MM)	hoch aggressives Melanom (HM)
WM-35	WM-793	SKmel-19	WM-451 LU
WM-3211	WM-115	M5	WM-1205 LU
SBCL-2	WM-3248	WM-852	BLM
WM-1552c	WM-1366	Mewo	
	WM-1819	IGR-39	
		MV3	

Die adhärent wachsenden Melanomzelllinien und Melanozyten wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Melanozyten wurden in Melanocyte Growth Medium Package ZHM-1955, und humane Melanomzellen in RPMI mit Glutamin mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert. Dabei wurden die Zellen je nach Konfluenz alle 3 - 4 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen zuerst mit kaltem PBS gewaschen und durch Inkubation für ca. 2 - 3 min. mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C deadhärtet. Der Trypsinierungsprozess wurde mit FCS-haltigem Medium beendet und die Zellen geerntet. Die Verdünnungsverhältnisse der Zellen betragen von 1:2 bis 1:10 je nach Zelllinie. Um die Zellzahl zu ermitteln wurden 10 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

### 3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Das Zellpellet wurde nach der Ernte in 0,5 - 1 ml Einfriermedium (10% DMSO in FCS) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und langsam bei -80°C über Nacht eingefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden mit 37°C warmen Kulturmedium aufgetaut, abzentrifugiert (5 min. bei 1500 rpm), in Medium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert.

### 3.3 Stimulation der Zellen

Die Zelldichte für die Stimulation betrug, je nach Zelllinie zwischen  $2,2 \times 10^5$  Zellen/ml und  $3,0 \times 10^5$  Zellen/ml. Für die Stimulationen wurden ausschließlich 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Nur für die Apoptosebestimmung mittels *Cell Death Detection* ELISA wurden 3,5 cm Zellkulturschalen eingesetzt. Für die UVB-Bestrahlung wurde das Kulturmedium durch 1x PBS ersetzt. Die UVB-Exposition erfolgte in einer Kammer mit sechs Ultraviolett-B-Lampen und einer Leistung von  $0,97 \text{ mJ/cm}^2/\text{sec}$ . Die Zellen wurden mit einer sublethalen UVB-Dosis (10 oder  $20 \text{ mJ/cm}^2$ ) oder einer apoptotischen Dosis  $40 \text{ mJ/cm}^2$  (Melanozyten) bestrahlt. Nach der UVB-Bestrahlung wurde das alte Medium wieder zugegeben. Das verwendete rekombinante, humane iz-TRAIL ist zur Ausbildung der trimerisierten, aktiven Form N-terminal mit einem Isoleuzin-Zipper Motiv verknüpft (Ganten et al., 2006). Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 50 - 1000 ng/ml iz-TRAIL stimuliert. Zellen die kostimuliert wurden, wurden zuerst mit UVB und unmittelbar danach mit TRAIL, MG132 ( $20 \mu\text{M}$ ) oder zQVD ( $20 \mu\text{M}$ ) stimuliert.

### 3.4 Gewinnung der Proteinextrakte

Die Zellen wurden nach der entsprechenden Stimulationsdauer geerntet. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 30 - 60  $\mu\text{l}$  Lysepuffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgte entweder durch 30-minütige Inkubation auf Eis oder durch Sonifizierung (1 Puls). Nach Zentrifugation (10 min. bei 13000 rpm) wurde das Zelllysate abgenommen und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Danach wurden die Proteine mit gleichem Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min. bei 95°C denaturiert und



anschließend 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde entweder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

### 3.5 Photometrische Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zellysaten wurde mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA durchgeführt. In einer 96-well-Platte wurde hierzu zunächst eine Standardverdünnungsreihe (50 – 0,025 µg/µl) von BSA in Bradford-Lösung angefertigt. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm in einem *ELISA-Reader*.

### 3.6 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli et al., 1970). Es kamen 10%, 12% und 15% Trenngele zum Einsatz. Gemäß der Proteinbestimmung wurden von jeder Probe 60 µg Proteinextrakt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer bei 30 mA für ca. 40 min.

### 3.7 Semi-dry Western-Blot und Immundetektion

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen wurde mit Hilfe des Western-Blots nach dem „Semi-dry“-Prinzip durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Blot folgendermaßen aufgebaut: Anode - 3 Filterpapiere - Membran - Gel - 3 Filterpapiere - Kathode. Pro Blot wurde für 90 min. eine Stromstärke von ca. 45 mA angelegt. Nach dem Ende des Transfers wurde die Membran kurz in 1x TBS äquilibriert. Danach wurde die Transfereffizienz der Proteine durch Färbung der Membran mit Ponceau-S dokumentiert und anschließend in 2% Blocking-Lösung (1 h bei RT) inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper erfolgte in 1% Blocking-Lösung über Nacht bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBST wurde der isotypspezifische und mit Peroxidase konjugierte, sekundäre Antikörper (anti-Kaninchen oder anti-Maus) für 1 h bei RT inkubiert und mit Hilfe des Chemilumineszenz-Verfahrens nach Angaben des Herstellers (West Dura, Pierce) oder mit selbst hergestellter Substratlösung detektiert. Dafür wurden 1 ml Lösung A, 0,1 ml Lösung B und 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusammenpipettiert. Die Lösung wurde vorsichtig auf die Membran getropft und

luftblasenfrei mit einer Folie abgedeckt. Nach anschließender, 5-minütiger Inkubation (im Dunkeln) folgte die Exposition des Röntgenfilmes in der Dunkelkammer.

### 3.8 Apoptosebestimmung mittels *Cell Death Detection* ELISA

Um die Apoptoserate von Zellen zu bestimmen, wurde der *Cell Death Detection* ELISA<sup>plus</sup>Kit (Roche Diagnostics) eingesetzt. Dieser Test misst die im Verlauf der Apoptose im Zytoplasma angereicherten Histon-assoziierten DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen). Die Melanomzelllinien wurden nach 16-stündiger Stimulation geerntet und die Anzahl nicht-nekrotischer Zellen (Trypanblau-Ausschlussverfahren) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Von jeder Stimulation wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um die Apoptoserate zu ermitteln, wurde das Verhältnis zwischen der Absorption der Probe und der Absorption unstimulierter Zellen bei 405 nm bestimmt. Der enrichment factor (EN) gibt an, wie sich die Anzahl der zytoplasmatischen Nukleosomen im Vergleich zu einer Kontrolle (EN = 1) erhöht haben.

### 3.9 Caspase-Aktivitätstest

Die für diesen Test ausgesäten Melanomzelllinien wurden entsprechend stimuliert und geerntet. Das Pellet wurde, je nach Größe, mit 60 - 100 µl Caspase-Lyse-Puffer resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden 15 µg Proteinextrakt mit 50 µl Aktivitätspuffer versetzt. Als Referenz diente das gleiche Volumen Lysepuffer. Kurz vor der Messung wurden zu den Proben und der Referenz je 75 µl der jeweiligen Substratlösung pipettiert. Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität wurden spezifische Substrate für Caspase-3 (Ac-DEVD-AMC), Caspase-8 (Ac-IETD-AMC) und Caspase-9 (Ac-LEHD-AMC) verwendet. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in Abständen von 15 min. in einem FluoStar Luminometer bei einer Extinktion von 390 nm und einer Emission von 460 nm. Die Caspase-Aktivität berechnet sich aus der Emission der Probe/Emission der Kontrollzellen.

### 3.10 m-RNA Isolation

Die mRNA-Isolierung wurde mittels der klassischen Methode nach Chomczynski und Sacchi durchgeführt (Chomczynski & Sacchi, 1987). Melanomzelllinien wurden zunächst für 4 h bzw. 8 h mit TRAIL bzw. TRAIL und UVB stimuliert. Danach wurden

die Zellen mit 500 µl GIT-Puffer geerntet. Die RNA-Isolierung wurde mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung der PLG (PhaseLockGel)-Reaktionsgefäße durchgeführt. Es wurden zuerst 40 µl 3 M Natriumacetat, 400 µl Phenol (pH 4,0) und 120 µl Chloroform:Isoamylalkohol (49:1) zum Lysat hinzugegeben, stark geschüttelt und dann für 10 min. auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min. bei 13000 rpm, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase abpipettiert. Danach erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mit 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein 2 ml PLG pipettiert und zur Entfernung des restlichen Phenols mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Nach starkem Schütteln wurde erneut abzentrifugiert (5 min. bei 13000 rpm, 4°C). Durch Zugabe eines äquivalenten Volumens von Isopropanol wurde die RNA gefällt und pelletiert (25 min. bei 13000 rpm, 4°C). Das RNA-Pellet wurde einmal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und danach an der Luft getrocknet (30 - 60 min.). Anschließend wurde das Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und zum vollständigen Lösen, über Nacht bei 4°C gelagert. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektrophotometers „Nano Drop“ und die Reinheit durch ein RNA-Agarosegel bestimmt.

### 3.11 RT-PCR Analysen

Für die RT-PCR wurde cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription (RT) aus der mRNA gewonnen wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels des „*First Strand cDNA Synthesis Kit*“ (Fermentas) nach Angaben des Herstellers aus jeweils 3 µg der unter 3.10 gewonnenen RNA pro Stimulation. Die Reagenzien wurden alle auf Eis zusammen pipettiert. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen der cDNA eingesetzt. Für XIAP wurde eine jeweils 10x höher konzentrierte cDNA-Verdünnung gewählt als für GAPDH. Die anschließenden Amplifikationsschritte durch die Polymerasenkettenreaktion (PCR) wurden unter Verwendung des „RedTaq™ReadyMix™PCR Reaction Mix“ durchgeführt. Für die Amplifikation des „Housekeeping“ Genes GAPDH wurden 22 Zyklen gefahren, bei der Amplifikation von XIAP waren es 44 Zyklen. Im Anschluss wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und auf einem 1,5 %igen DNA-Agarosegel analysiert.

**Tabelle 3.11.1:** Pipettierschema für die PCR

	Reaktions- ansatz	Kontrolle ohne Template	Kontrolle ohne Primer
dd H <sub>2</sub> O , steril	9,5 µl	10,5 µl	11,5 µl
Red-Taq	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
cDNA	1 µl	-	1 µl
Primer for (100 ng/µl)	1 µl	1 µl	-
Primer rev (100 ng/µl )	1 µl	1 µl	-
Kurz mischen und abzentrifugieren			

**Tabelle 3.11.2:** PCR-Bedingungen

Vorgang	Zeit	Temperatur	Zahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min.	95 °C	1x
Denaturierung	1 min.	95 °C	22x (GAPDH & Bax) 44x (XIAP & FLIP)
Annealing	1 min.	60 °C	
Elongation	2 min.	72 °C	
Letzte Elongation	7 min.	72 °C	1 x
Aufbewahrung	∞	4 °C	1 x

### 3.12 Transfektion durch Elektroporation

In Elektroporationsküvetten wurden 25 µg Plasmid-DNA vorgelegt und auf Eis gelagert. Als Transfektionsmedium wurde RPMI-Medium mit 10% FCS und 1,5% DMSO vorbereitet, in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) (pro Ansatz 600 µl) überführt und ebenfalls auf Eis gestellt. Die Zellen wurden geerntet und das Pellet zweimal mit 10 ml kaltem 1x PBS gewaschen. Für jeden Ansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Das benötigte Zellvolumen wurde für 5 min. bei 1500 rpm pelletiert, in Transfektionsmedium resuspendiert und in die vorbereiteten Elektroporationsküvetten überführt. Nach vorsichtigem Mischen der Suspension wurden die Zellen elektroporiert (Elektroporationsparameter: 250 V, 1200 µF). Danach wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Medium (RPMI + 10% FCS) überführt und bei 37°C inkubiert.

### 3.13 Transfektion mit Lipofectamin 2000

Für die siRNA-Transfektion wurde Lipofectamin 2000 verwendet. Die Zellen wurden am Vortag in einer 12-well-Zellkulturplatte ausgesät ( $6 \times 10^4$  pro well). 2  $\mu$ l Lipofectamin 2000 wurden mit 100  $\mu$ l Optimem-Medium verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. wurden zu dieser Mischung 50 pmol siRNA in 100  $\mu$ l Optimem zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Transfektionslösung für 20 min. bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Zuvor wurde das alte Medium entfernt. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 48 h bzw. 72 h bei 37°C inkubiert. Am Tag der Stimulation erfolgte morgens ein Mediumwechsel.

### 3.14 Durchflusszytometrie

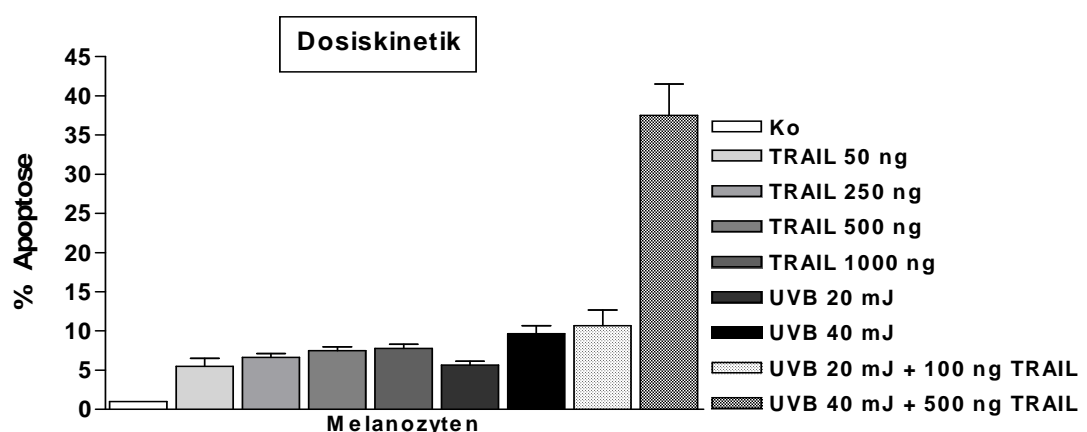
In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Expression der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren untersucht. Es wurden pro Ansatz  $5 \times 10^5$  Zellen verwendet. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation des Zellpellets in 1% BSA/PBS für 30 min. auf Eis blockiert. Nach erneuter Pellettierung (5 min. bei 1200 rpm) wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurden die Melanomzellen mit je 1  $\mu$ g spezifischen, monoklonalen Maus-Antikörpern, die gegen die unterschiedlichen TRAIL-Rezeptoren gerichtet sind, für 1 h auf Eis inkubiert (anti-TRAIL-R1 (M271, IgG2a), anti-TRAIL-R2 (M413), anti-TRAIL-R3 (M430) and anti-TRAIL-R4 (M445, IgG1). Die Antikörper wurden jeweils in 100  $\mu$ l 1% BSA/PBS verdünnt. Anschließend wurden die Zellen 2x gewaschen (1% BSA/PBS) und mit FITC-konjugiertem Antikörper (Verdünnung 1:200) für 30 min. auf Eis inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurden. Anschließend wurde das Pellet in 1% BSA/PBS resuspendiert (400  $\mu$ l) und mittels Durchflusszytometrie (EPICS XL-MCL) analysiert. Von jeder Probe wurden insgesamt 20.000 Zellen analysiert. Mit einer Wellenlänge von 488 nm wurde FITC angeregt und die dadurch emittierte Fluoreszenz-Zunahme durch Verwendung eines (FL-1) Bandpassfilters detektiert.

## IV. Ergebnisse

### 4.1 Apoptoseverhalten von Melanozyten und Melanomzellen

#### 4.1.1 Apoptoserate von Melanozyten nach Stimulation mit TRAIL, UVB sowie Kostimulation mit TRAIL und UVB

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Apoptoseverhalten von primären Melanozyten gegenüber TRAIL und UVB untersucht. Dabei sollte unter anderem der bereits bekannte Sachverhalt, dass TRAIL die Apoptose nur in transformierten Zellen induziert, bestätigt werden. Hierbei war es entscheidend, die eingesetzte TRAIL-Konzentration, sowie auch die UVB-Dosis so zu wählen, dass sie bei einem späteren, potentiellen therapeutischen Einsatz (oder Einsatz *in vivo*) nur in transformierten Zellen eine apoptotische Wirkung auslöst, nicht aber in normalen Melanozyten. Das gleiche galt für eine Kostimulation mit TRAIL und UVB. So sollte auch die Kostimulation ausschließlich die transformierten Zellen abtöten und Melanozyten verschonen. Um dies zu gewährleisten, wurden primäre Melanozyten mit einer TRAIL-Dosiskinetik, einer UVB-Dosiskinetik und einer Kombination aus beiden stimuliert. Die Apoptoserate wurde nach 16h mittels Durchführung eines „Cell Death Detection ELISA“ analysiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich lösliches, rekombinantes Isoleuzin-Zipper-TRAIL (iz-TRAIL) verwendet.

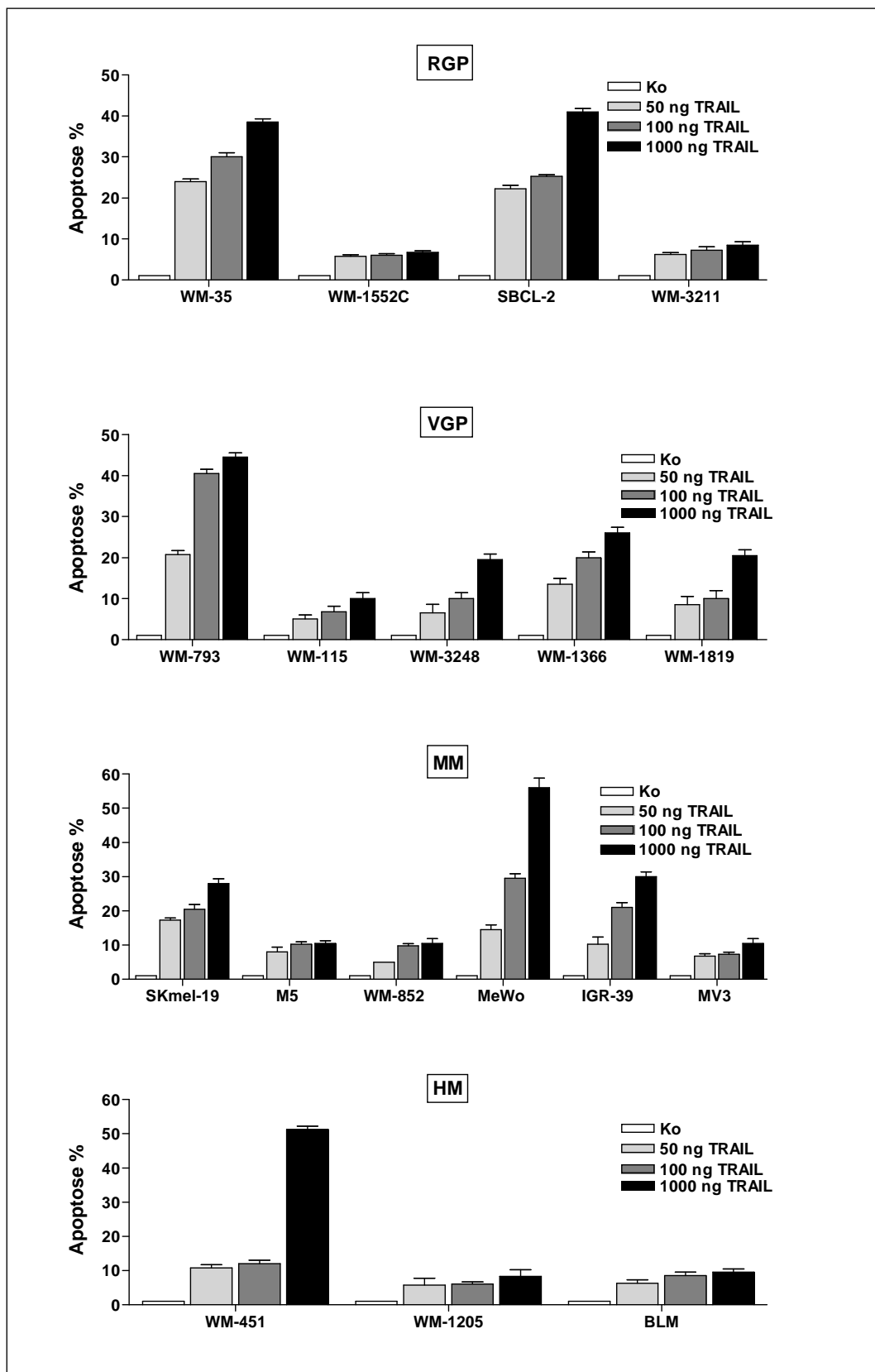


**Abbildung 4.1.1:** Melanozyten sind auch gegenüber starken apoptotischen Stimuli resistent: Melanozyten wurden mit 50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml TRAIL; mit 20 mJ/cm<sup>2</sup> und 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB stimuliert; und mit 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und 100 ng/ml TRAIL sowie mit 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und 500 ng/ml TRAIL kostimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach 16 h wurde die Apoptoserate in einem „Cell Death Detection ELISA“ ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Es wurde festgelegt, dass eine Apoptoserate kleiner 10% bedeutet, dass die Zellen resistent (R) gegenüber dem Stimulus waren. Lag die Apoptoserate zwischen 10% und 30% bedeutete dies, dass die Zellen leicht sensitiv (s) reagierten. Bei einer Apoptoserate über 30% wurden die Zellen als hoch sensitiv (S) klassifiziert. Die Melanozyten (Abb. 4.1.1) waren sogar gegenüber einer TRAIL-Konzentration von 1000 ng/ml apoptoseresistent. Ebenso konnte selbst eine hohe UVB-Dosis (40 mJ/cm<sup>2</sup>) keine Apoptose in normalen Melanozyten induzieren. Nur die Kostimulation bestehend aus einer hohen TRAIL-Konzentration mit einer hohen UVB-Dosis (500 ng/ml TRAIL mit 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB) induzierte die Apoptose in Melanozyten. Im Gegensatz dazu induzierte die Kombination aus 100 ng/ml TRAIL mit 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB keine Apoptose und könnte somit potentiell als wirksame Dosis für die Melanomtherapie dienen.

#### **4.1.2 TRAIL induzierte Apoptose in Melanomzelllinien**

Um das vergleichende Apoptoseverhalten im Melanomsystem festzustellen und um zu untersuchen, ob die TRAIL-Suszeptibilität vom Tumorprogressionsstadium abhängt, wurde eine TRAIL-Konzentrationskinetik mit den 18 verschiedenen, humanen Melanomzelllinien aus definierten Tumorprogressionsstadien durchgeführt. Die Apoptoserate nahm in 10 Melanomzelllinien (WM-35, SBCL-2, WM-793, WM-3248, WM-1366, WM-1819, SKmel-19, MeWo, IGR-39 und WM-451) kontinuierlich mit ansteigender TRAIL-Konzentration zu (Abb. 4.1.2). WM-3248, WM-1366, WM-1819, SKmel-19 und IGR-39 wurden dabei als leicht sensitiv (s) eingestuft. Im Vergleich zu den anderen 5 Melanomzelllinien, welche eine hohe Apoptoserate von über 30% erreichten, lag die Apoptoserate dieser Zelllinien zwischen 10% und 30%. Die restlichen 8 Melanomzelllinien waren selbst gegenüber einer Stimulation mit 1000 ng TRAIL-resistent. Dabei schien das Tumorprogressionsstadium keine Rolle zu spielen, da in allen Stadien sowohl TRAIL-resistente als auch TRAIL-sensitive Zelllinien existierten. Nach der TRAIL-Dosiskinetik der Melanomzelllinien und der Charakterisierung der Melanozyten wurde 100 ng TRAIL als therapeutischer Dosisbereich ermittelt und diese Konzentration für alle weiteren Experimente gewählt.



**Abbildung 4.1.2:** TRAIL-Dosiskinetik von Melanomzelllinien: Ergebnis des Death-ELISA nach 16-stündiger Stimulation. Die Melanomzelllinien wurden mit 50 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml TRAIL stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

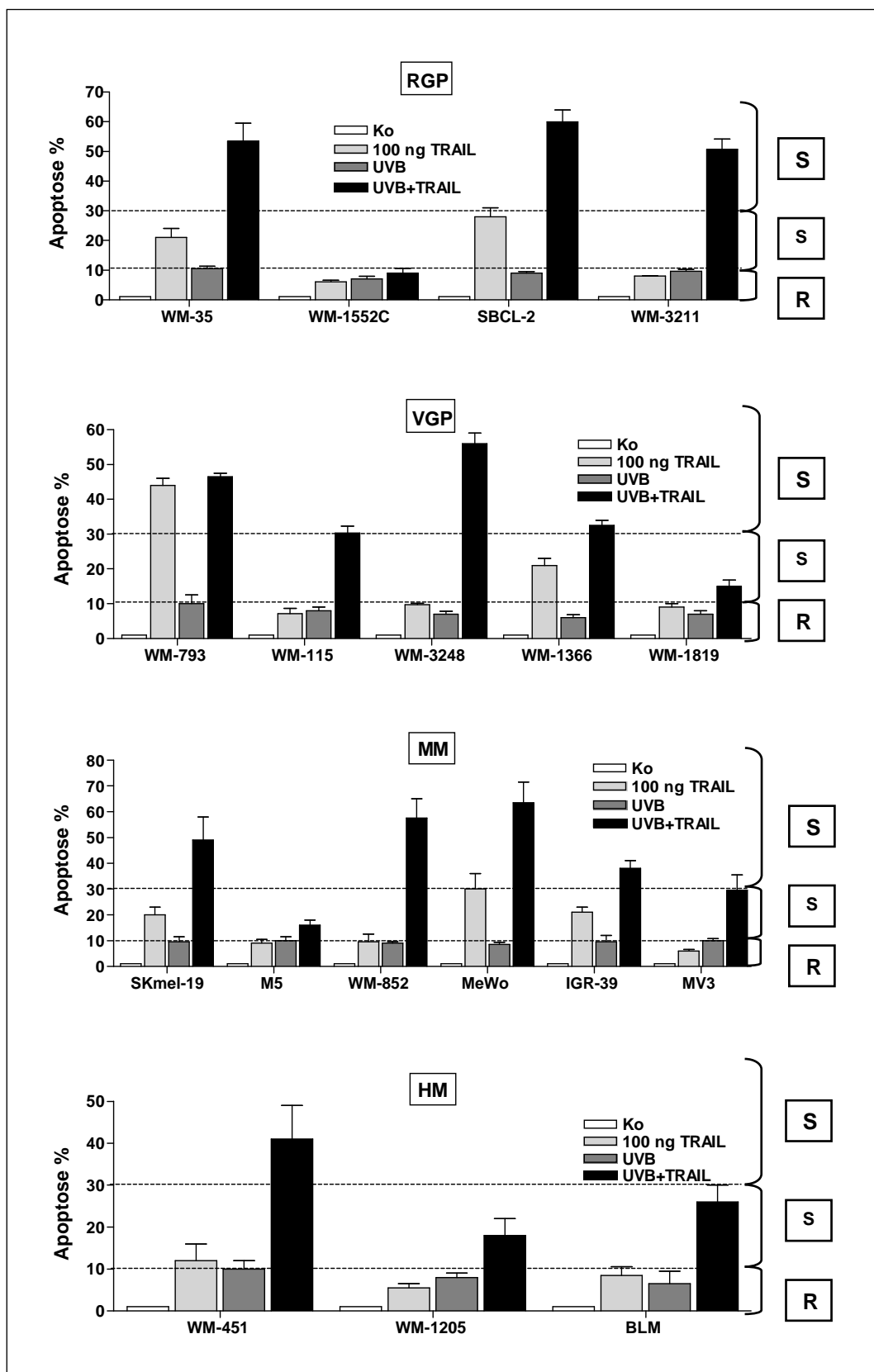


#### 4.1.3 Sensitivierung der Melanomzelllinien gegenüber TRAIL durch Bestrahlung mit einer sublethalen UVB-Dosis

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass TRAIL-resistente Melanomzelllinien durch Bestrahlung mit sublethalen UVB-Dosen gegenüber TRAIL sensitiviert werden können (Zeise et al., 2004). Als UVB-Dosis wurde also eine Dosis gewählt, die selbst keine Apoptose induzieren kann. Die sublethale Dosis betrug  $20 \text{ mJ/cm}^2$  für 10 Zelllinien (WM-1552C, WM-3211, WM-793, WM-3248, WM-1366, WM-1819, MV3, WM-451, WM-1205, BLM) und  $10 \text{ mJ/cm}^2$  für die restlichen 8 Melanomzelllinien (WM-35, SBCL-2, WM-115, SKmel-19, M5, WM-852, MeWO und IGR-39). Die Apoptoserate der 18 Melanomzelllinien wurde nach Stimulation mit  $100 \text{ ng/ml}$  TRAIL, einer UVB-Dosis von 10 bzw.  $20 \text{ mJ/cm}^2$ , sowie einer Kombination aus beiden bestimmt.

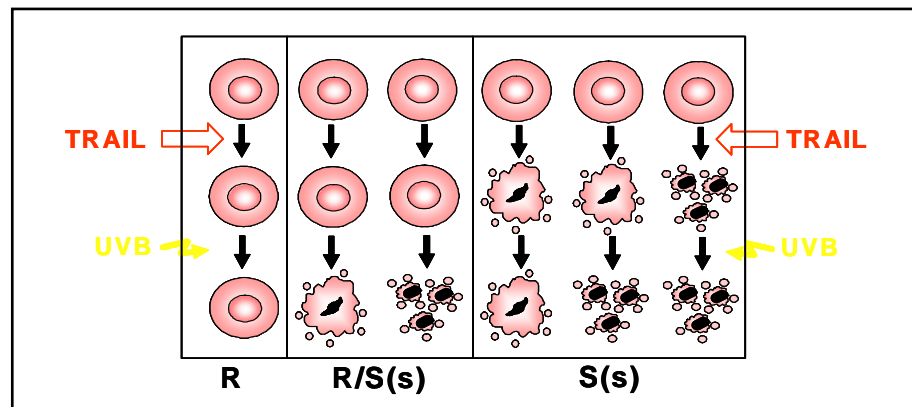
Die Melanomzelllinien der RGP zeigten eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber TRAIL (Abb. 4.1.3). Auch gegenüber der sublethalen UVB-Dosis zeigten sie einen enormen Unterschied in der jeweiligen Sensitivierbarkeit. So waren die Zelllinien WM-35 und SBCL-2 gegenüber TRAIL sensitiv, allerdings war die Apoptoserate so gering, dass sie als leicht sensitiv (s) eingestuft wurden. Von den TRAIL-resistenten Zelllinien WM-1552C und WM-3211 konnte lediglich letztere durch Bestrahlung mit UVB gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose sensitiviert werden, während WM-1552C selbst nach einer Kostimulation mit der sublethalen UVB-Dosis resistent blieb. Die TRAIL-sensitiven Zelllinien WM-35 und SBCL-2 zeigten nach der Kostimulation eine synergistisch gesteigerte Apoptoserate. Die Apoptoserate betrug dabei mehr als 50%.

Die Zellen der VGP zeigten ein ähnliches Verhalten gegenüber der Kostimulation. WM-793 und WM-1366 waren sensitiv gegenüber TRAIL. Bei WM-793 induzierte TRAIL eine hohe Apoptoserate, weswegen diese Zelllinie als hoch sensitiv (S) eingestuft wurde. Durch UVB konnte keine weitere Steigerung der Apoptose erreicht werden. WM-1366 wurde als leicht sensitiv (s) eingestuft. Die sublethale UVB-Strahlung war in der Lage, die resistenten Zelllinien WM-115, WM-3248 und WM-1819 gegenüber TRAIL zu sensibilisieren, wobei für die Zelllinie WM-1819 nur eine leichte Sensibilisierung erreicht werden konnte (Abb. 4.1.3 (1)).



**Abbildung 4.1.3 (1):** UVB-Kostimulation sensibilisiert TRAIL-resistente Melanomzelllinien: Ergebnis des Death-ELISA nach 16-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL, 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und Kostimulation mit 100 ng/ml TRAIL und 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Auch die Melanomzelllinien des MM (Abb. 4.1.3 (1)) zeigten eine unterschiedliche Verhaltensweise gegenüber TRAIL und UVB-Strahlung. Die Zelllinien SKmel-19, MeWo und IGR-39 waren sensitiv gegenüber TRAIL, wohingegen die Linien M5, WM-852 und MV3 TRAIL-resistent waren. Auch hier war die sublethale UVB-Dosis in der Lage, die TRAIL-resistenten Zelllinien gegenüber TRAIL zu sensibilisieren und bei den TRAIL-sensitiven Zelllinien eine synergistische Erhöhung der Apoptose zu induzieren. Die Zellen des HM zeigten ein ähnliches Verhaltensmuster wie die der RGP, VGP und MM. Nur WM-451 zeigte eine leichte Sensitivität gegenüber TRAIL. WM-1205 und BLM waren hingegen TRAIL-resistent. Die sublethale UVB-Strahlung sensibilisierte die TRAIL-resistenten Melanomzelllinien und war außerdem in der Lage, wie bei den anderen Progressionsstadien, die Apoptoserate synergistisch zu erhöhen.



**Abbildung 4.1.3 (2):** Schematische Zusammenfassung der in den durchgeführten Experimenten erhaltenen, zellulären Antworten auf Stimulationen mit TRAIL und die Folgen der Kostimulation mit UVB: R= resistent, S= hoch sensitiv und s = leicht sensitiv.

**Tabelle 4.1.1:** Die TRAIL-Suszeptibilität der Melanomzelllinien ist unabhängig vom Tumorprogressionsstadium:

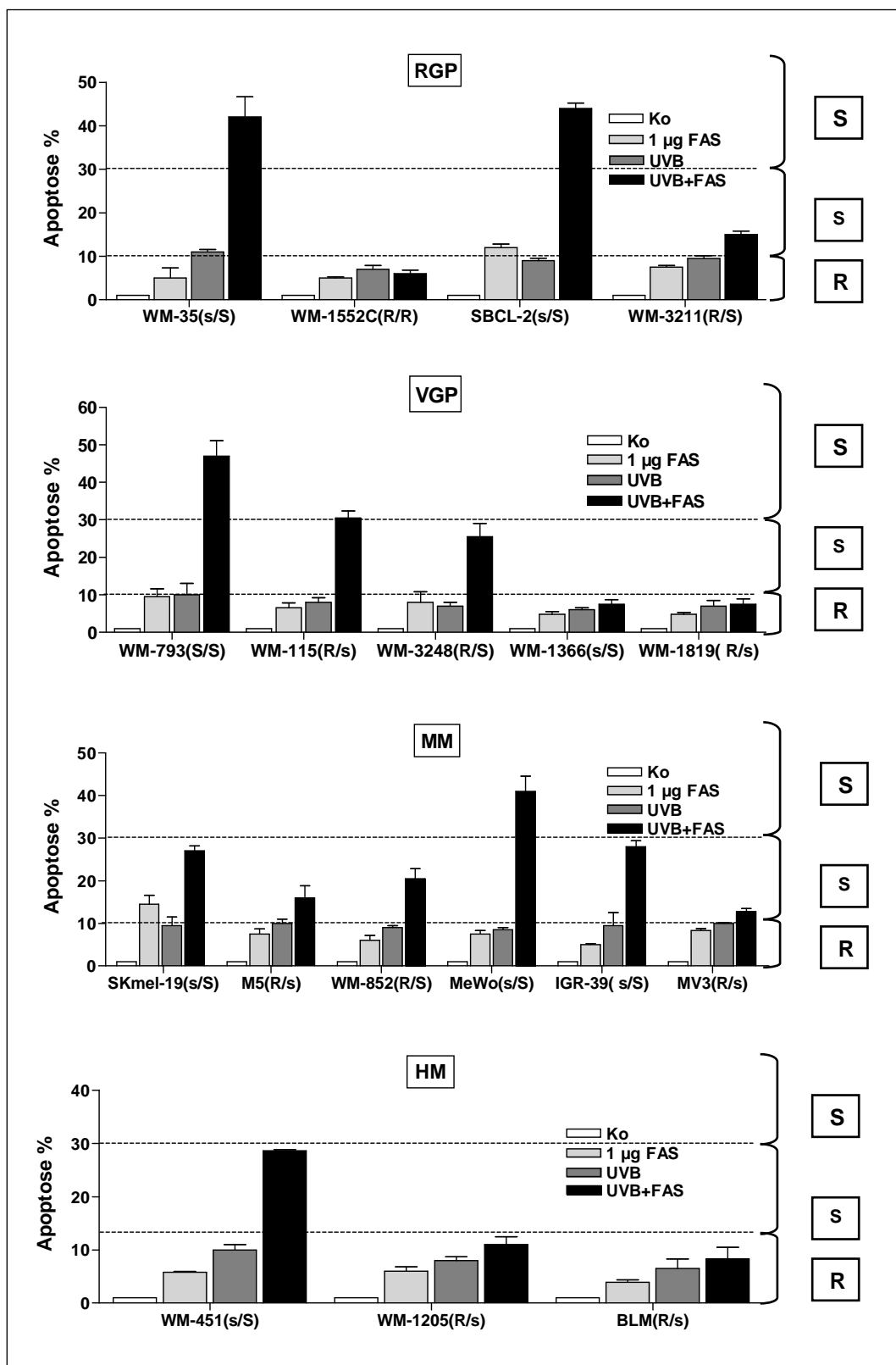
Tumorprogressionsstadien	Melanomzelllinie	TRAIL Suszeptibilität
radiale Wachstumsphase (RGP)	WM-35	s/S
	WM -1552C	R/R
	SBCL-2	s/S
	WM-3211	R/S
vertikale Wachstumsphase (VGP)	WM- 793	S/S
	WM- 115	R/s
	WM- 3248	R/S
	WM -1366	s/S
	WM -1819	R/s
metastatisches Melanom (MM)	SKmel- 19	s/S
	M5	R/s
	WM- 852	R/S
	MeWO	s/S
	IGR-39	s/S
	MV 3	R/s
hoch aggressives Melanom (HM)	WM- 451	s/S
	WM- 1205	R/s
	BLM	R/s

#### 4.1.4 Suszeptibilität der Melanomzelllinien gegenüber dem Todesliganden FAS

Um zu überprüfen, ob die UVB-induzierte Sensitivierung von Melanomzellen ein Spezifikum für die TRAIL-induzierte Apoptose ist oder auch Allgemeingültigkeit für andere Todesliganden hat, wurde sowohl das Apoptoseverhalten der Melanomzelllinien auf Fas-Stimulation, als auch auf die Kostimulation mit Fas und UVB untersucht. Die Zellen wurden nach Stimulation mit agonistischem Fas-AK, einer sublethalen UVB-Dosis, sowie der Kostimulation von FAS-AK mit UVB auf ihre apoptotische Reaktion überprüft.

FAS induzierte nur in zwei Melanomzelllinien (SBCL-2 (RGP), SKmel-19 (MM)) eine geringe Apoptoserate (s). Die restlichen 16 Zelllinien waren FAS-resistent (R) (Abb. 4.1.4). Auch hier scheint es keine Korrelation zwischen der FAS-Suszeptibilität und dem

Tumorprogressionsstadium zu geben, da die beiden FAS-sensitiven Melanomzelllinien aus unterschiedlichen Progressionsstadien stammten. Mittels der sublethalen UVB-Strahlung konnten 12 der 16 FAS-resistenten Melanomzelllinien sensibilisiert werden. Dabei wurde eine hohe Apoptoserate (S) in fünf Melanomzelllinien (WM-35, SBCL-2, WM-793, WM-115, MeWo) und eine lediglich geringe Apoptoserate (s) in den restlichen neun Zelllinien (WM-3211, WM-3248, SKmel-19, M5, WM-852, IGR-39, MV3, WM-451, WM-1205) induziert. In den beiden FAS-sensitiven Zelllinien wurde die Apoptoserate durch die sublethale UVB-Dosis ebenfalls synergistisch erhöht. Vier Melanomzelllinien blieben selbst nach Kostimulation mit FAS und UVB resistent (WM-1552C, WM-1366, WM-1819, BLM). Grundsätzlich scheint es sich also bei der synergistischen Sensitivierbarkeit von Melanomzellen durch sublethale UVB-Strahlung gegenüber der Todesligand-induzierten Apoptose um einen weitgehend generalisierbaren Mechanismus zu handeln.

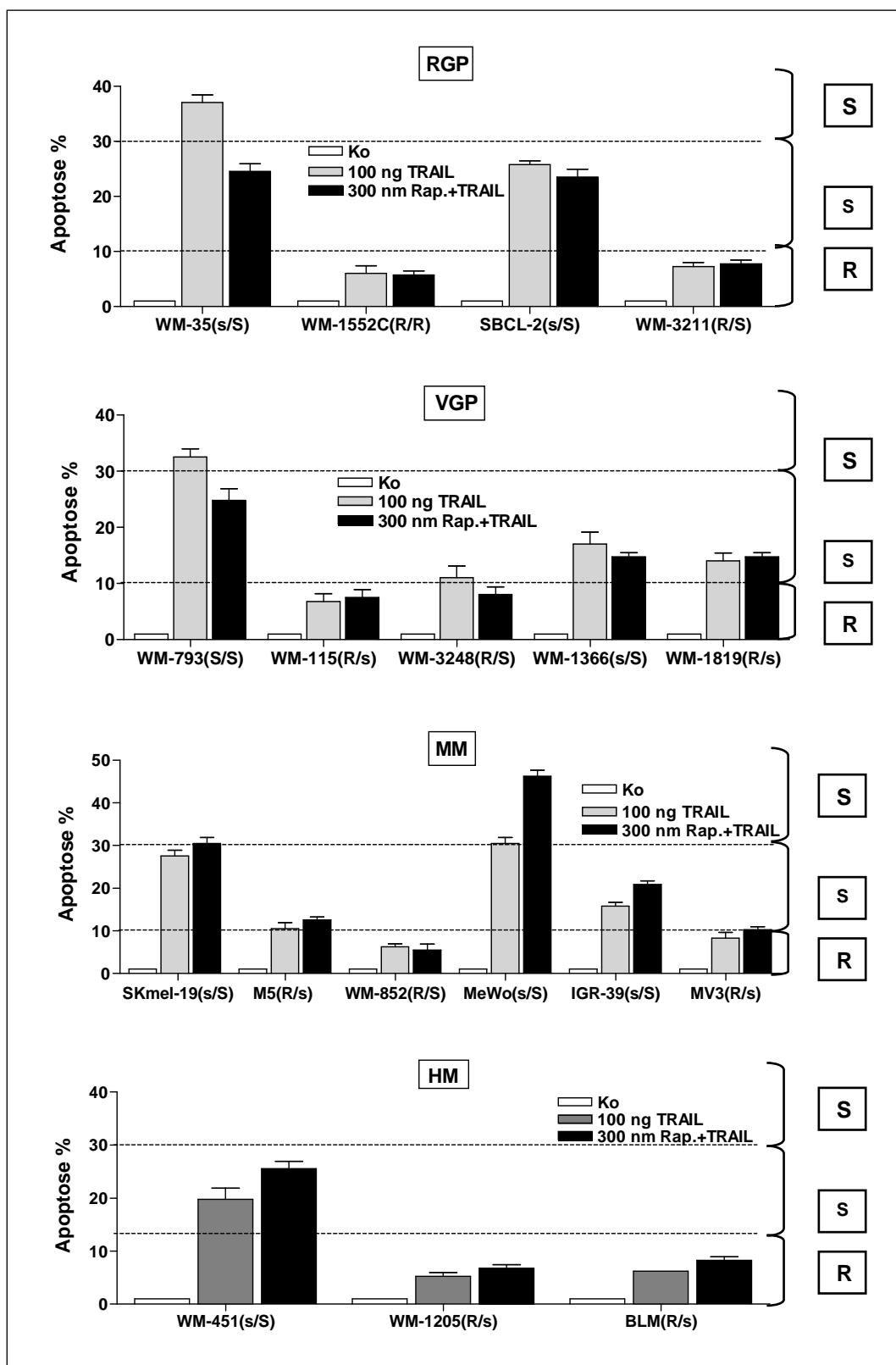


**Abbildung 4.1.4:** Sensitivierbarkeit der Melanomzelllinien gegenüber Fas-Stimulation: Ergebnis des Death-ELISA nach 16-stündiger Stimulation mit 1 µg/ml FAS-AK, 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und der Kostimulation von 1 µg/ml FAS mit 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

#### **4.1.5 Führt Kostimulation mit dem Immunsuppressivum Rapamycin ebenfalls zur Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose in Melanomzelllinien?**

Obwohl die UVB-Strahlung die Fähigkeit besitzt, alle TRAIL-resistenten Zelllinien – bis auf eine Ausnahme – zu sensibilisieren, kann die UVB-Strahlung therapeutisch nur für kutane Melanome, nicht aber für Metastasen eingesetzt werden. Durch den mTOR Inhibitor Rapamycin mit ebenfalls immunsuppressiver Wirkung, konnten in Einzelstudien bereits TRAIL Sensitivierungen für das Krebsystem nachgewiesen werden (Panner et al., 2005). Somit wäre Rapamycin ein idealer Ersatz für die UVB-Strahlung zur Therapie tieferliegender Metastasen. Um die Wirkungsweise von Rapamycin zu erforschen, wurde die Apoptoserate aller 18 Melanomzelllinien nach TRAIL-Stimulation bzw. nach Kostimulation mit TRAIL und Rapamycin analysiert.

Eine Kostimulation mit Rapamycin und TRAIL (Abb. 4.1.5) führte zu keiner synergistischen Steigerung der Apoptoserate. Im Gegensatz zu der Kostimulation mit UVB-Strahlung konnte die Mehrheit der TRAIL-resistenten Zelllinien nicht sensibilisiert werden (WM-3211, WM-115, WM-3248, M5, WM-852, MV3, WM-1205 und BLM). Rapamycin schien in 13 Melanomzelllinien überhaupt keine Wirkung zu haben. Nur bei 3 der untersuchten Zelllinien wurde eine leichte Steigerung der Apoptoserate erzielt (MeWO, IGR-39 und WM-451). In den Zelllinien WM-35 und WM-793 konnte sogar eine verringerte Apoptoserate nach der Kostimulation mit Rapamycin ermittelt werden.



**Abbildung 4.1.5:** Die Kostimulation mit Rapamycin führt nicht zu einer Steigerung der Apoptoserate: Ergebnis des Death-ELISA nach 16-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL bzw. Kostimulation mit 100 ng/ml TRAIL und 300 nm Rapamycin. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

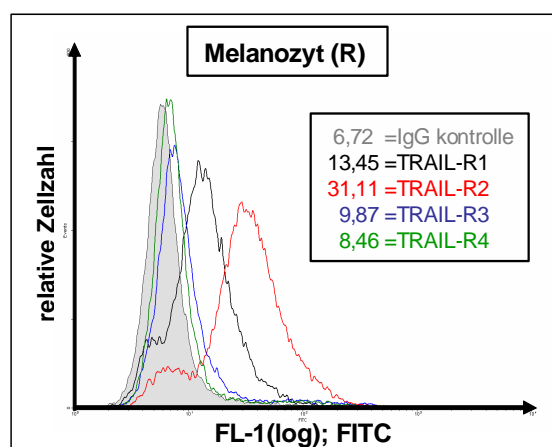


## 4.2 Die TRAIL-Rezeptorexpression

### 4.2.1 Die TRAIL-Rezeptorexpression in TRAIL-resistenten primären Melanozyten

TRAIL induziert die Apoptose nur über die agonistischen Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Pan et al., 1996; Walczak et al., 1997; Sheridan et al., 1997). Die Köderrezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 hingegen sind durch die fehlende bzw. unvollständige intrazelluläre Todesdomäne (Marsters et al., 1997) nicht in der Lage, das apoptotische Signal weiterzuleiten (Degli-Esposti et al., 1997a; MacFarlane et al., 1997; Sheridan et al., 1997). Ein Grund für die TRAIL-Resistenz könnte folglich mit einer verminderten Expression der agonistischen TRAIL-Rezeptoren zusammenhängen. Um diese Tatsache zu überprüfen, wurde zunächst die Oberflächen-Expression der TRAIL-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Die TRAIL-resistenten, primären Melanozyten zeigten eine sehr starke Expression des agonistischen Rezeptors TRAIL-R2. Auch TRAIL-R1 wurde in signifikanter Menge auf der Zelloberfläche exprimiert. Im Gegensatz dazu war die Expression der Köderrezeptoren verhältnismäßig schwach (Abb. 4.2.1). Die Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrollfärbung (delta Gmean) bis 5 wurde als keine, zwischen 5 und 10 als schwache und über 10 als starke Expression klassifiziert. Die delta Gmean-Werte wurden berechnet und in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 4.2.1).



**Abbildung 4.2.1:** TRAIL-resistente, primäre Melanozyten exprimieren die agonistischen TRAIL-Rezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2: Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität durch spezifische Antikörperbindung im Vergleich zu Kontrollzellen (grau), von TRAIL-R1 (schwarz), TRAIL-R2 (rot), TRAIL-R3 (blau) und TRAIL-R4 (grün).

#### 4.2.2 Die TRAIL-Rezeptorexpression der Melanomzelllinien

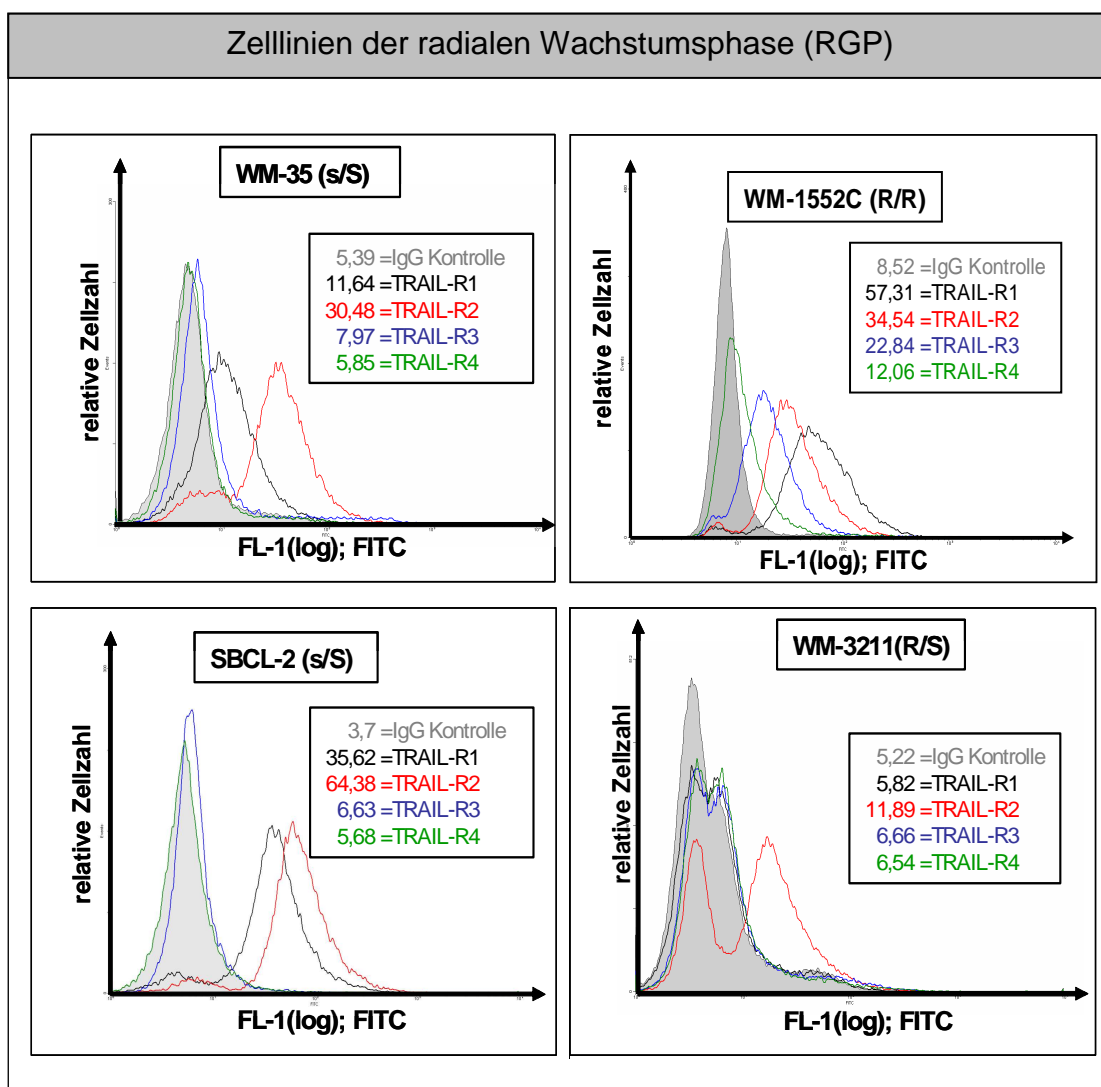
Die meisten Melanomzelllinien (WM-35 (s/S), WM-3211 (R/S), SBCL-2 (s/S)) der RGP exprimierten entweder TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder beide Transmembranrezeptoren. Die Köderrezeptoren wurden hingegen kaum exprimiert. Die TRAIL-resistente Melanomzelllinie WM-1552C exprimierte als einzige den Köderrezeptor TRAIL-R3, wohingegen die ebenfalls TRAIL-resistente SBCL-2 Zelllinie keinen der Köderrezeptoren exprimiert (Abb. 4.2.2 (RGP)).

Auch die meisten Zellen der VGP (WM-793 (S/S), WM-115 (R/s), WM-3248 (R/S) und WM-1366 (s/S)) exprimierten entweder TRAIL-R1, TRAIL-2 oder beide Rezeptoren. Nur die TRAIL-resistente Zelllinie WM-1819 zeigte eine niedrige Expression aller TRAIL-Rezeptoren, was möglicherweise mit ihrer TRAIL-Resistenz korreliert. Andererseits wies die ebenfalls TRAIL-resistente Zelllinie WM-3248 eine starke Expression des agonistischen Rezeptors TRAIL-R2, aber keinerlei Köderrezeptor-Expression auf (Abb. 4.2.2 (VGP)).

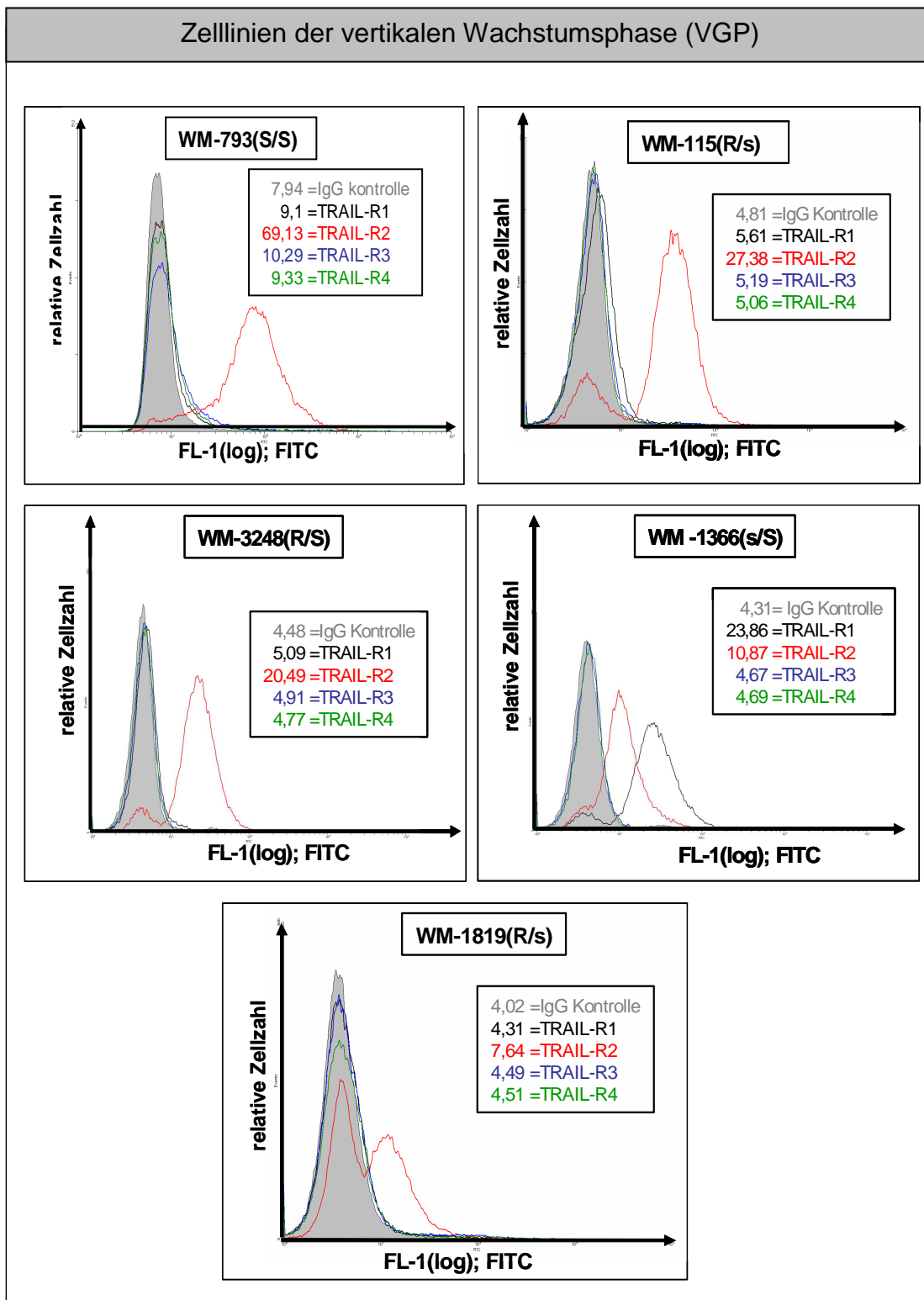
Ebenso wie die Zellen der RGP und VGP exprimierten die Zellen des MM (bis auf Skmel-10 und MeWO) entweder TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder beides (Abb. 4.2.2 (MM)). Die TRAIL-sensitiven Zelllinien Skmel-19 und MeWO exprimierten TRAIL-R2 nur sehr schwach. TRAIL-R1 wurde von ihnen überhaupt nicht exprimiert. Im Vergleich zu der Expression an agonistischen TRAIL-Rezeptoren war das Expressionsniveau der Köderrezeptoren auch bei den Zelllinien dieses Progressionsstadiums sehr gering (Abb. 4.2.2 (MM)).

Auch die Zellen des HM exprimierten entweder TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder beide TRAIL-Rezeptoren (Abb. 4.2.2 (HM)). Wie bei den anderen Zellen, schien es bei den Zellen des HM keine Korrelation zwischen dem Expressionsprofil der TRAIL-Rezeptoren und der TRAIL-Resistenz zu geben. Die TRAIL-sensitive Zelllinie WM-451 exprimiert TRAIL-R1 überhaupt nicht und auch die Expression von TRAIL-R2 war relativ gering im Gegensatz zu der TRAIL-resistenten Zelllinie WM-1205, die TRAIL-R2 am stärksten in diesem Progressionsstadium exprimiert.

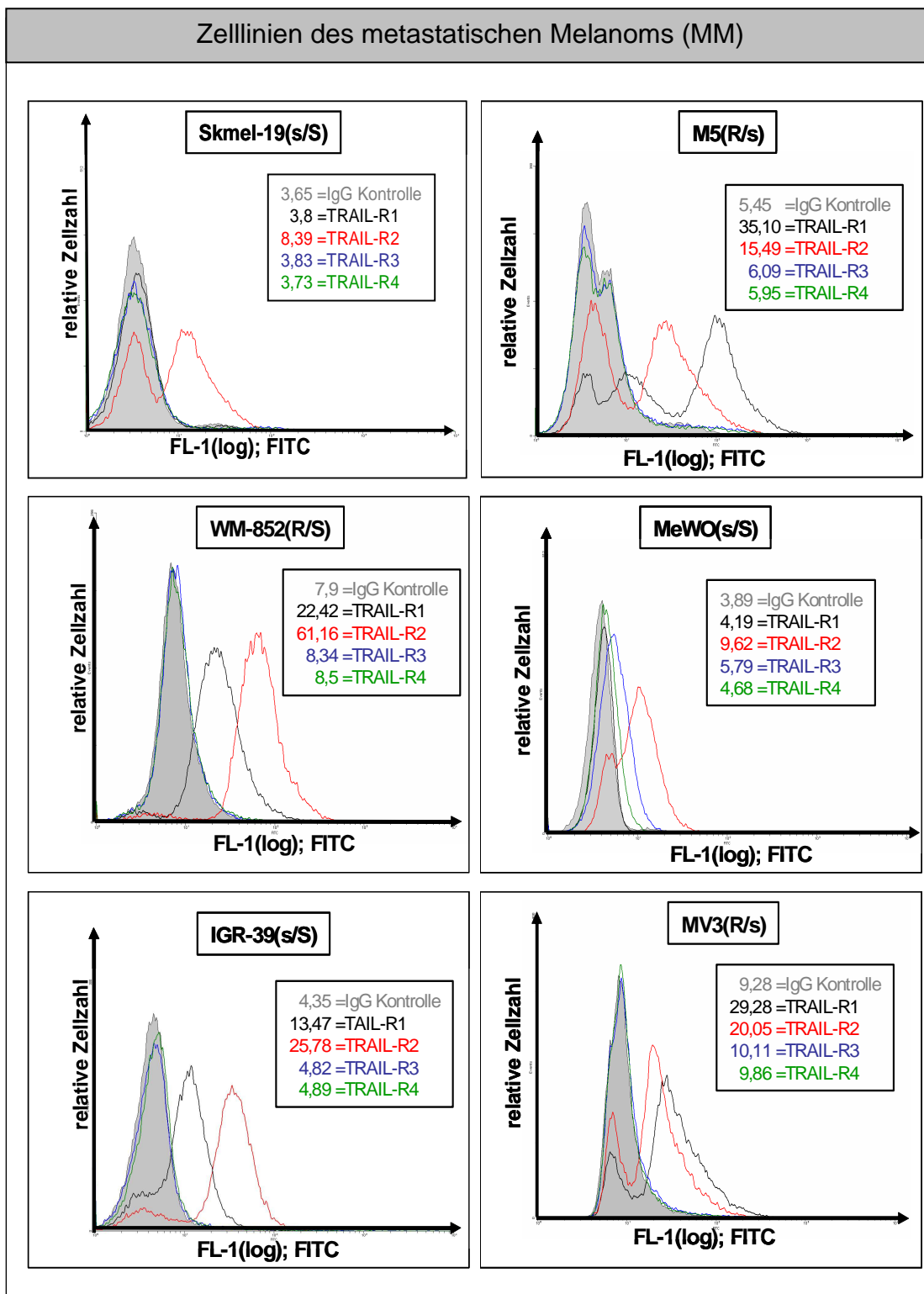
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die meisten Melanomzelllinien entweder TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder beide Rezeptortypen exprimierten. In 13 Melanomzelllinien wurde TRAIL-R2 sehr stark exprimiert, 3 Zelllinien zeigten hingegen nur eine schwache Expression und bei 2 Zelllinien wurde TRAIL-R2 nicht exprimiert. Dagegen war die Expression von TRAIL-R1 nur in 6 Zelllinien sehr stark, in weiteren 4 Zelllinien hingegen schwach und die restlichen 8 Zelllinien exprimierten TRAIL-R1 überhaupt nicht. Von den Köderrezeptoren wurde ausschließlich TRAIL-R3 in einer einzigen TRAIL-resistenten Zelllinie in geringen Mengen exprimiert. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass das Expressionsmuster agonistischer und antagonistischer TRAIL-Rezeptoren nicht allein ausschlaggebend für die TRAIL-Suszeptibilität sein kann.



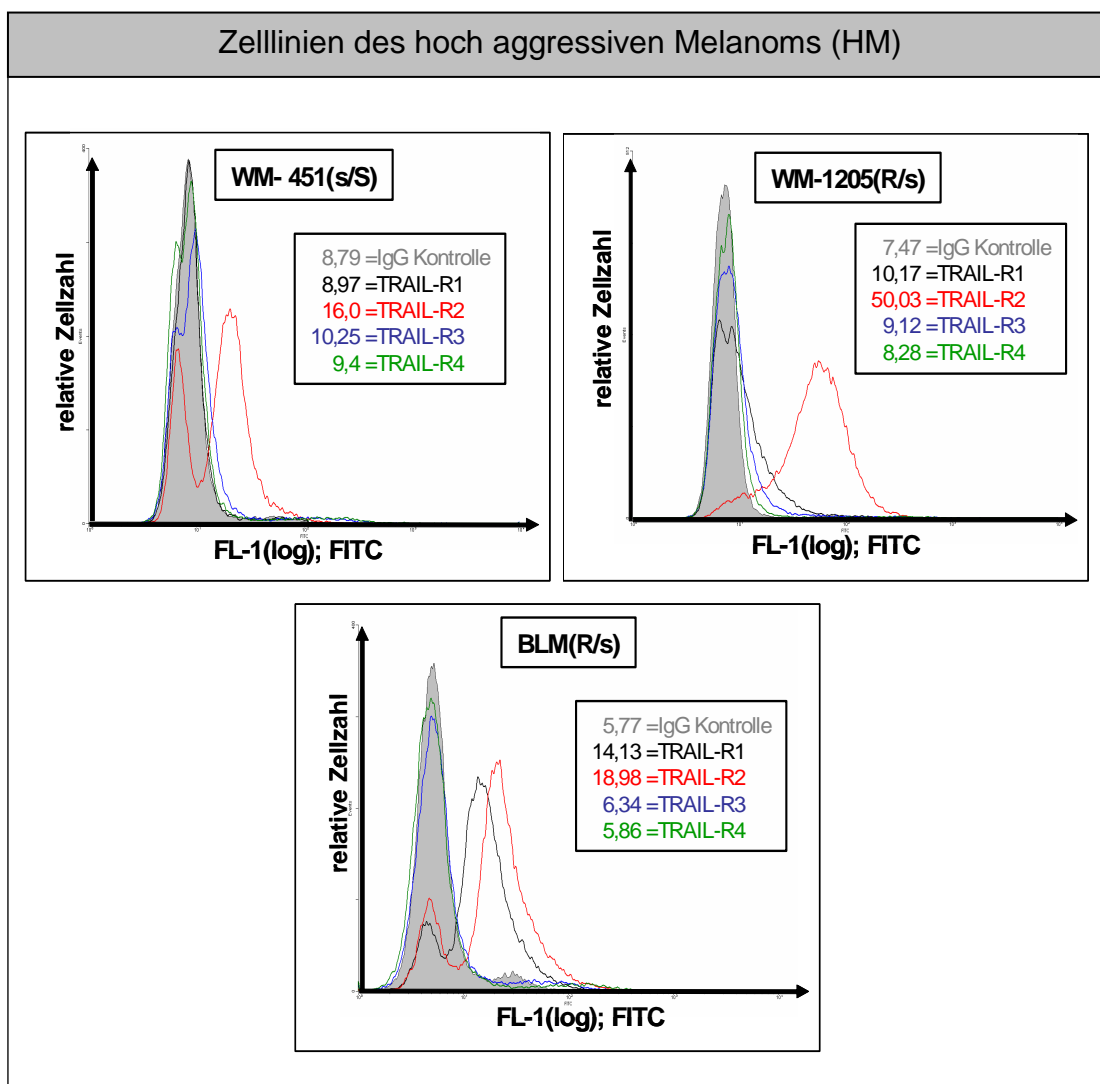
**Abbildung 4.2.2:** Das Expressionsmuster der agonistischen und antagonistischen TRAIL-Rezeptoren korreliert nicht eindeutig mit der TRAIL-Suszeptibilität der Melanomzelllinien. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität durch spezifische Antikörperbindung im Vergleich zu Kontrollzellen (grau), von TRAIL-R1 (schwarz), TRAIL-R2 (rot), TRAIL-R3 (blau) und TRAIL-R4 (grün).



Abbildungsfortsetzung der TRAIL-Rezeptoren-Expression (RGP)



Abbildungsfortsetzung der TRAIL-Rezeptoren-Expression (MM).



Abbildungsfortsetzung der TRAIL-Rezeptoren-Expression (HM).

**Tabelle 4.2.1:** Zusammenfassung der delta Gmean-Werte der TRAIL-Rezeptorexpression

	TRAIL-R1	TRAIL-R2	TRAIL-R3	TRAIL-R4	TRAIL-Suszeptibilität	Tumor-progressionsstadium
Melanozyten	6,7	24,4	3,2	1,7	R/R	
WM-35	6,3	25,1	2,6	0,5	s/S	<b>RGP</b>
WM-1552C	48,79	26,02	14,32	4	R/R	
SBCL-2	31,9	60,6	2,9	2	s/S	
WM-3211	0,6	6,67	1,44	1,32	R/S	
WM-793	1,2	61,2	2,4	1,4	S/S	
WM-115	0,8	22,6	0,4	0,3	R/s	<b>VGP</b>
WM-3248	0,6	16,0	0,4	0,3	R/S	
WM-1366	19,6	6,6	0,4	0,4	s/S	
WM-1818	0,3	3,6	0,4	0,5	R/s	
SKmel-19	0,15	4,74	0,18	0,08	s/S	
M5	29,65	10,04	0,64	0,5	R/s	<b>MM</b>
WM-852	14,5	53,3	0,4	0,6	R/S	
MeWO	0,3	5,73	1,9	0,79	s/S	
IGR-39	9,1	21,4	0,5	0,5	s/S	
MV3	20,0	10,7	0,8	0,6	R/s	
WM-451	0,0	7,3	1,5	0,6	s/S	<b>HM</b>
WM-1205	2,7	42,6	1,6	0,8	R/s	
BLM	8,4	13,2	0,6	0,1	R/s	

### 4.3 Die Expression apoptotischer und anti-apoptotischer Proteine in Melanomzelllinien

Das intrazelluläre Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine kann sich entscheidend auf die zelluläre Antwort gegenüber apoptotischer Stimuli auswirken. Da das Muster der TRAIL-Rezeptorexpression nicht die Hauptursache für die TRAIL-Resistenz in Melanomzelllinien darstellte, wurde im nächsten Schritt das basale Expressionsniveau intrazellulärer pro- und antiapoptotischer Proteine mittels Western-Blot-Analyse determiniert. Es wurden deshalb die relativen Expressionsverhältnisse der direkten Gegenspieler Caspase-8/FLIP und Caspase-3/XIAP untersucht.

#### 4.3.1 Das relative Expressionsprofil von Caspase-8 und FLIP<sub>Long</sub> / Short (FLIP<sub>L/S</sub>)

Bei resistenten Zelllinien würde man eine erhöhte FLIP gegenüber Caspase-8-Expression erwarten und umgekehrt eine erhöhte Caspase-8 versus FLIP Expression in TRAIL-sensitiven Zelllinien. Eine erhöhte TRAIL-Resistenz könnte auch mit einer verstärkten FLIP<sub>S</sub>-Expression einhergehen (Zeise et al., 2004). Insgesamt wurden in den untersuchten Melanomzelllinien nur geringe oder gar keine FLIP<sub>S</sub>-Expressionen verzeichnet (Abb. 4.3.1). In den Melanomzelllinien der RGP schien keine Korrelation zwischen der TRAIL-Resistenz und der Proteinexpression zu bestehen. Einzige Ausnahme war die TRAIL-resistente Zelllinie WM-1552C (R/R), die zumindest eine starke FLIP<sub>L</sub>-Expression zeigte. In der ebenfalls TRAIL-resistenten Zelllinie WM-3211 (R/S) konnte dagegen keine signifikante FLIP<sub>L</sub>-Expression dokumentiert werden. FLIP<sub>S</sub> wurde in keiner der Melanomzelllinien der RGP exprimiert. Auch die Caspase-8-Expression ließ keine eindeutige Aussage zu, da sowohl TRAIL-resistente als auch TRAIL-sensitive Zelllinien vergleichbare Mengen an Caspase-8 exprimierten (WM-35 (s/S), WM-1552 (R/R) und SBCL-2 (s/S)). Nur in einer der TRAIL-resistenten Zelllinien, der Zelllinie WM-3211, wurde Caspase-8 schwach exprimiert.

Die Zellen der VGP verhielten sich ähnlich wie die Zellen der RGP (Abb. 4.3.1). Die Zelllinien WM-793 (S/S), WM-115 (R/s), WM-3248 (R/S) und WM-1316 (s/S)

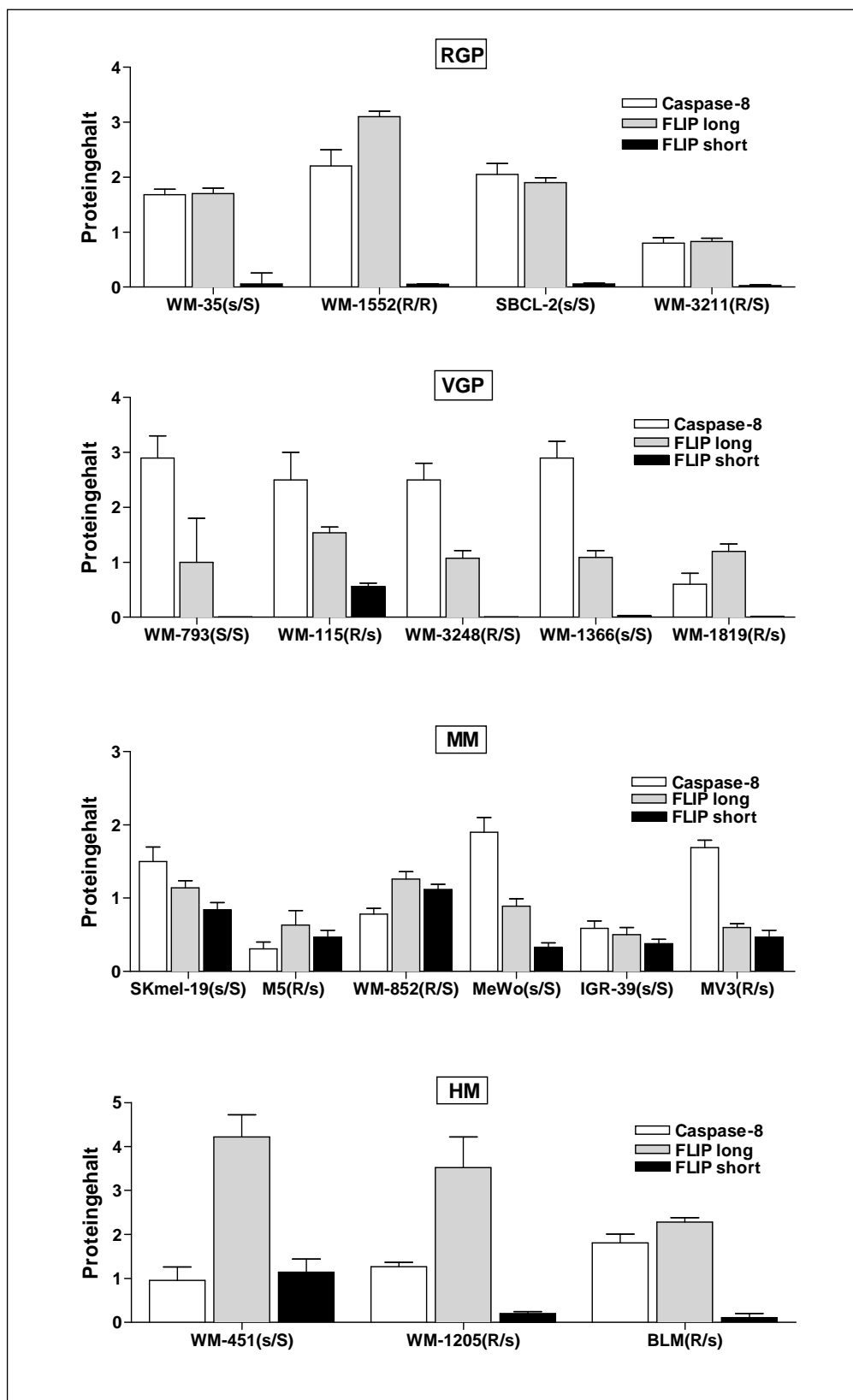


exprimierten vergleichbare Mengen an Caspase-8, unabhängig von ihrer TRAIL-Suszeptibilität. Nur eine TRAIL-resistente Zelllinie (WM-1819) zeigte eine schwächere Caspase-8 Expression. Auch die Expression des FLIP<sub>L</sub> war in allen Zelllinien ähnlich. WM-115 (R/s) exprimierte als einzige Zelllinie FLIP<sub>S</sub> in geringer Menge.

In den Zelllinien des MM (Abb. 4.3.1) war die Expression der Caspase-8 in SKmel-19 (s/S), MeWo (s/S) und MV3 (R/s) höher als in den Zelllinien M5 (R/s), WM-852 (R/S) und IGR-39 (s/S). Somit exprimierten nur 2 der 3 resistenten Zelllinien (M5, WM-852) verhältnismäßig geringe Caspase-8 Mengen. Auch die Expression von FLIP<sub>L</sub> war weitestgehend gleichmäßig stark in 3 Zelllinien (SKmel-19 (s/S), IGR-39 (s/S), MV3 (R/s)) und gleichmäßig schwach in den 3 anderen Zelllinien (M5 (R/s), WM-852 (R/S), MeWO (s/S)). Alle untersuchten Zelllinien des MM exprimierten FLIP<sub>S</sub>, aber nur SKmel-19 (s/S) und WM-852 (R/S) in größeren Mengen. So scheint auch in diesem Progressionsstadium keine eindeutige Korrelation zwischen der relativen Expressionsrate von Caspase-8 und FLIP und der TRAIL-Suszeptibilität zu existieren.

Alle 3 Melanomzelllinien des HM (Abb. 4.3.1) exprimierten unabhängig von ihrer TRAIL-Suszeptibilität Caspase-8 und FLIP<sub>L</sub>. Nur eine der Zelllinien, die einzig sensitive, exprimierte FLIP<sub>S</sub> (WM-451 (s/S)). Lediglich in diesem Progressionsstadium exprimierten alle 3 Melanomzelllinien des HM eine höhere Menge an FLIP<sub>L</sub> im Vergleich zu Caspase-8, wiederum unabhängig von der TRAIL-Suszeptibilität.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich nur in den wenigsten Melanomzelllinien ein Zusammenhang zwischen der TRAIL-Resistenz und der relativen Caspase-8/FLIP-Expression anzudeuten scheint (Abb. 4.3.1), es grundsätzlich aber keine eindeutige Korrelation zwischen diesem Expressionsmuster und dem Apoptoseverhalten der Zelllinien gegenüber TRAIL gibt.

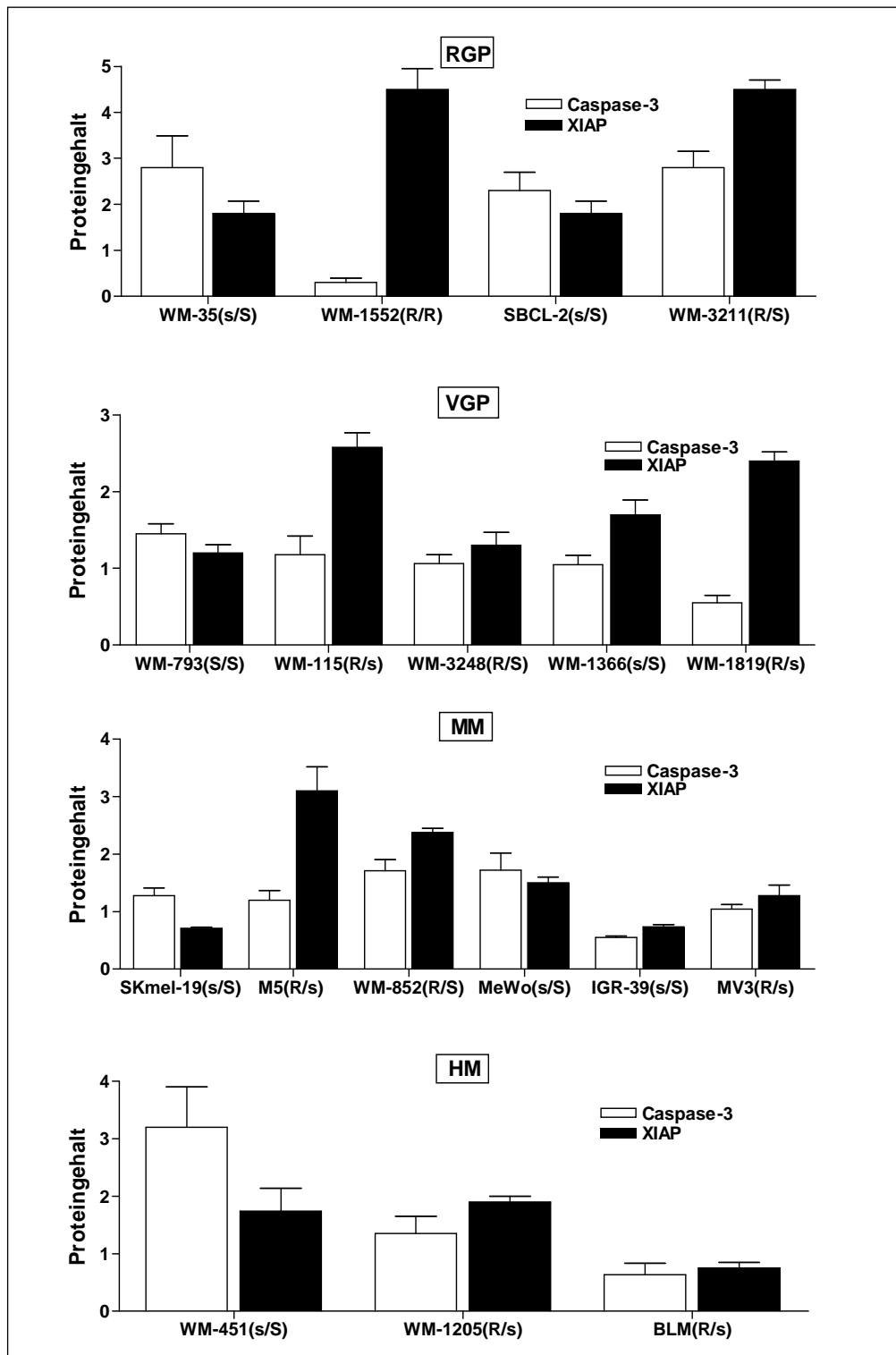


**Abbildung 4.3.1:** Expressionsprofil des apoptotischen Proteins Caspase-8 und der anti-apoptotischen Proteine FLIP<sub>L</sub> bzw. FLIP<sub>S</sub>: Nach Western-Blot-Analyse erfolgte die densitometrische Auswertung der unstimulierten Melanomzelllinien. Als Referenz wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

### 4.3.2 Das relative Expressionsprofil von Caspase-3 und XIAP

Im Gegensatz zu dem Caspase-8/FLIP-Expressionsmuster, scheint eine Korrelation zwischen dem XIAP/Caspase-3-Expressionsmuster und der apoptotischen Antwort zu existieren (Abb. 4.3.2). In der RGP exprimierten nur die sensitiven Zelllinien WM-35 (s/S) und SBCL-2 (s/S) größere Mengen Caspase-3, während die resistenten Zelllinien WM-1552C (R/R) und WM-3211 (R/S) nur sehr wenig Caspase-3 exprimierten. Für das antiapoptotische Protein XIAP war das Ergebnis ebenfalls ziemlich eindeutig: nur die zwei TRAIL-resistenten Zelllinien WM-1552C und WM-3211 exprimierten relativ größere XIAP-Mengen. Das Verhältnis zwischen XIAP und Caspase-3 lag bei sensitiven Zelllinien (WM-35 (s/S), SBCL-2 (s/S)) eindeutig auf der Seite von Caspase-3 und bei resistenten Zelllinien (WM-3211 (R/S), WM-1552C (R/R)) deutlich auf der Seite von XIAP. Ebenso exprimierten die resistenten Zelllinien der VGP größere Mengen XIAP als Caspase-3 (WM-115 (R/s), WM-3248 (R/S), WM-1819 (R/s)). Die sensitive Zelllinie WM-793 exprimierte, ebenfalls entsprechend ihres Apoptoseverhaltens, größere Mengen an Caspase-3 als XIAP. Nur die leicht sensitive Zelllinie WM-1366 (s/S) exprimierte im Verhältnis mehr XIAP als Caspase-3. Die sensitiven Zelllinien des MM (Skmel-19 (s/S), MeWo (s/S)) exprimierten, wie die Zellen der RGP und VGP, mehr Caspase-3 als XIAP. Auch die Expressionsmuster der resistenten Zelllinien entsprachen ihrem Apoptoseverhalten. Sie exprimierten im Verhältnis mehr XIAP als Caspase-3 ((M5 (R/s), WM-852 (R/S), MV3 (R/s)). Nur die leicht sensitive Zelllinie IGR-39 (s/S) exprimierte vergleichbare Mengen XIAP und Caspase-3. Die Zelllinien des HM zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Die sensitive Zelllinie WM-451 (s/S) exprimierte im Verhältnis mehr Caspase-3 als XIAP. Die restlichen zwei resistenten Zelllinien (WM-1205 (R/s), BLM (R/s)) exprimierten im Verhältnis mehr XIAP als Caspase-3, was wiederum jeweils ihrem Apoptoseverhalten entspricht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in 6 der 8 sensitiven Melanomzelllinien im Verhältnis mehr Caspase-3 als XIAP exprimiert wurde. Entsprechend wurde in den 10 resistenten Zelllinien im Verhältnis mehr XIAP als Caspase-3 exprimiert. In 7 dieser Zelllinien war das Verhältnis zwischen XIAP und Caspase-3 signifikant (Abb. 4.3.2). Man kann daraus schlussfolgern, dass die TRAIL-Resistenz vermutlich eher auf dem Niveau von Caspase-3/XIAP als im Bereich des DISC im Caspase-8/FLIP „cross talk“ entschieden wird.



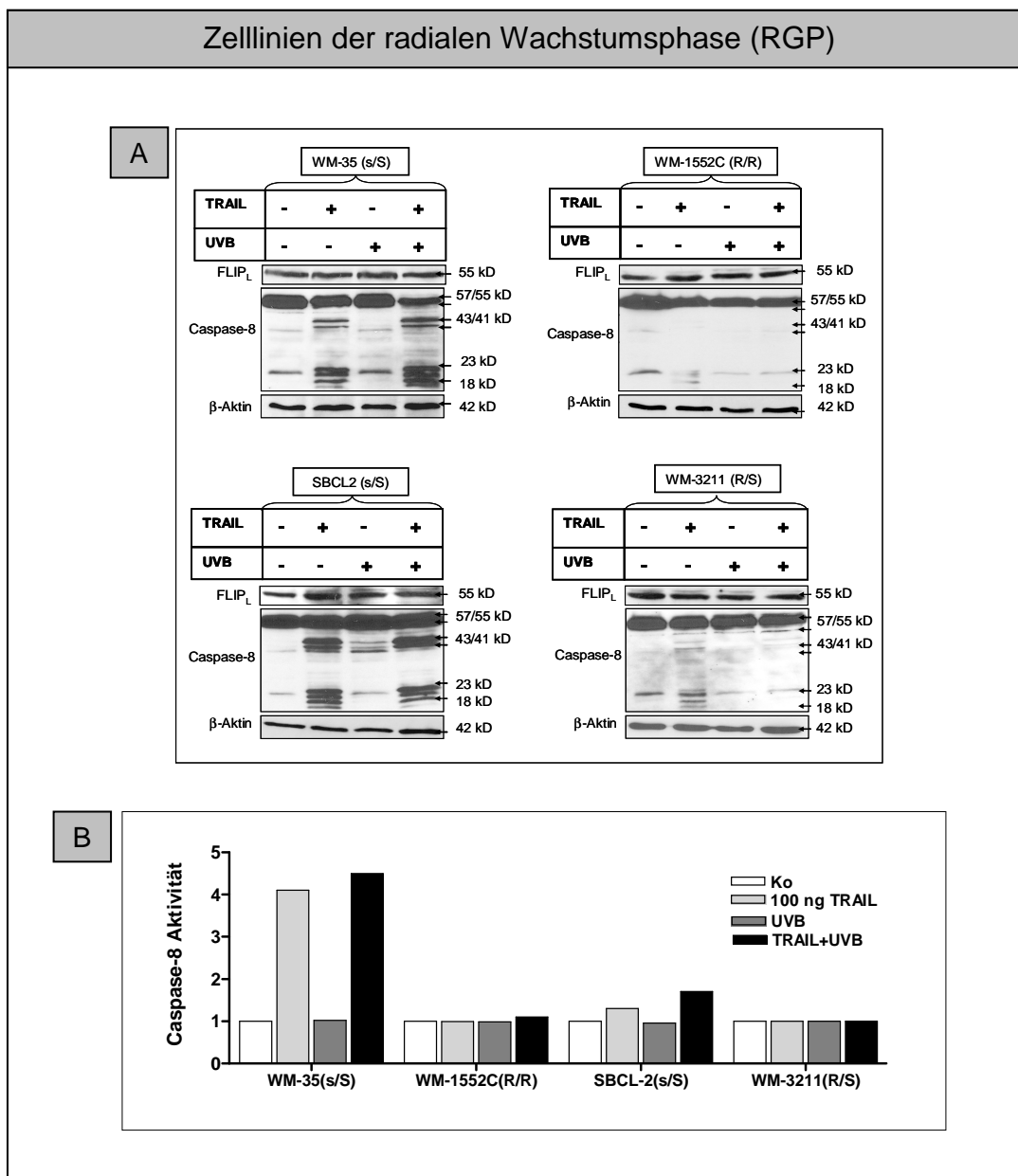
**Abbildung 4.3.2:** XIAP/Caspase-3-Expressionsmuster korreliert mit Apoptoseverhalten: Nach Western-Blot-Analyse erfolgte die densitometrische Auswertung der unstimulierten Melanomzelllinien. Als Referenz wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

#### 4.4 Die Rolle von Caspase-8 und FLIP<sub>L</sub> in TRAIL-resistenten Melanomzellen

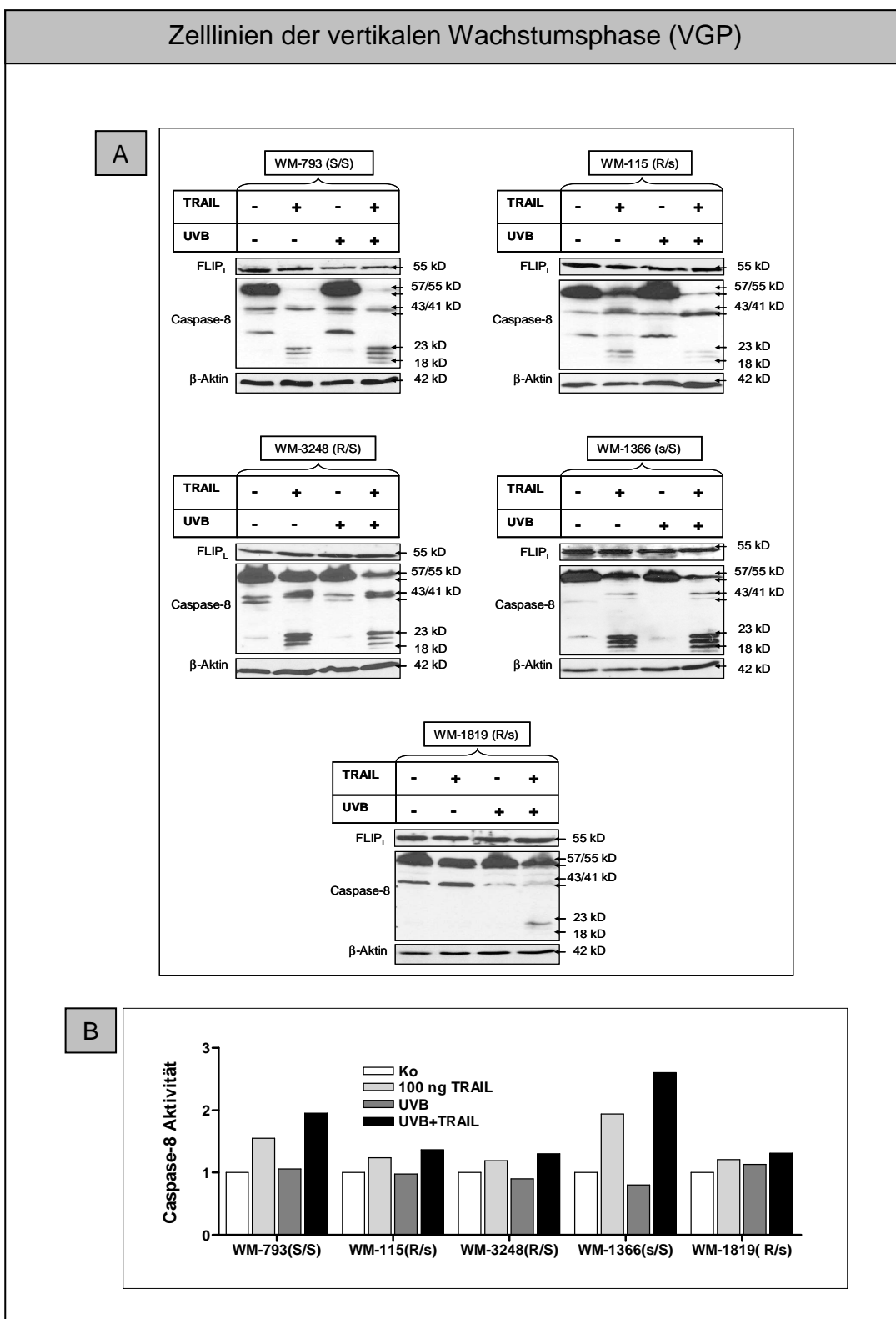
Der Vergleich des basalen Proteinexpressionsniveaus zeigte, dass die TRAIL-Resistenz nicht eindeutig mit dem Expressionsverhältnis zwischen Caspase-8 und FLIP<sub>L/S</sub> korrelierte. Folglich sollte die TRAIL-Sensitivierung der Melanomzellen durch UVB-Strahlung nicht mit einer verstärkten Prozessierung der Caspase-8 und/oder einer Veränderung des FLIP<sub>L</sub>-Expressionsniveaus einhergehen. Beides wurde nach Stimulation mit TRAIL und Kostimulation mit UVB mittels Western-Blot-Analyse ermittelt. Um die Ergebnisse zusätzlich abzusichern, wurde ein Caspase-8-Aktivitätsassay zur Bestimmung ihrer proteolytischer Aktivität unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen durchgeführt.

Die Ergebnisse des Caspase-8-Aktivitätsassays stimmten weitgehend mit der Caspase-8-Prozessierung überein. In allen 8 sensitiven Melanomzelllinien (WM-35 (s/S), SBCL-2 (s/S), WM-793 (S/S), WM-1366 (s/S), SKmel-19 (s/S), MeWO (s/S), IGR-39 (s/S); WM-451 (s/S)) wurde sowohl nach 6-stündiger Stimulation mit TRAIL als auch nach Kostimulation mit UVB eine Caspase-8 Prozessierung und Aktivierung entsprechend ihres Apoptoseverhaltens festgestellt (Abb. 4.4.1A+B). Die Caspase-8 wurde in den meisten TRAIL-resistenten Melanomzelllinien nicht prozessiert. Allerdings konnte in einigen resistenten Zelllinien (WM-115 (R/s), WM-3248 (R/s), MV3 (R/s)) eine eindeutige Caspase-8-Prozessierung ermittelt werden, jedoch ohne eine messbare katalytische Aktivierung. Durch UVB-Kostimulation konnte in keiner der TRAIL-resistenten Melanomzelllinien eine Steigerung der Caspase-8-Prozessierung erzielt werden. Der FLIP<sub>L</sub>-Status blieb in allen 18 Melanomzelllinien unabhängig von der Stimulation konstant. Somit scheint die UVB-Kostimulation zu diesem frühen Zeitpunkt ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die FLIP-Proteinexpression auszuüben.

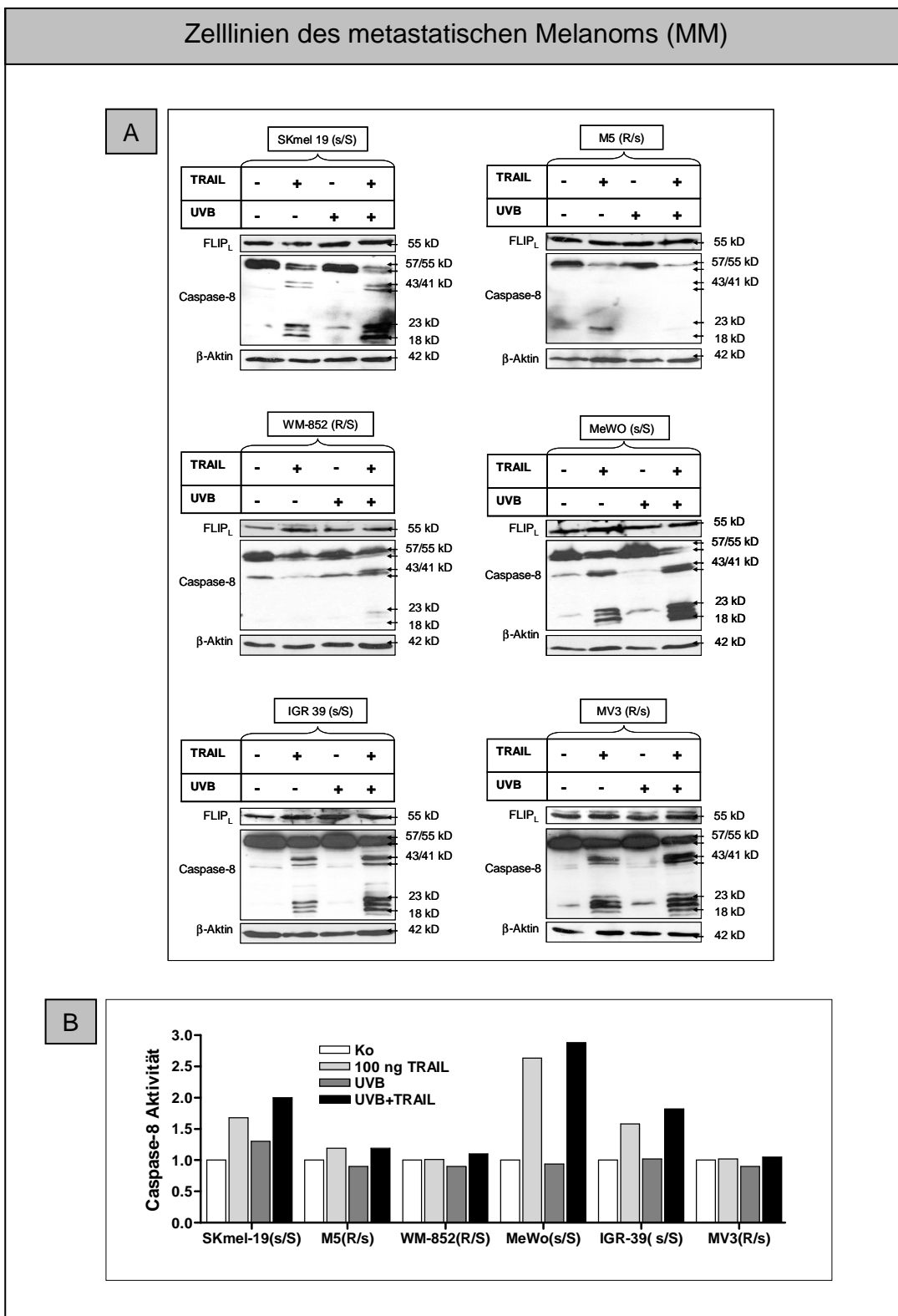
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der FLIP- und Caspase-8-Prozessierungsstatus nicht die entscheidende Rolle in der UVB-induzierten Sensitivierung der Melanomzellen gegenüber TRAIL spielt.



**Abbildung 4.4.1:** FLIP<sub>L</sub>- und Caspase-8-Prozessierungsstatus spielen nicht die entscheidende Rolle in der UVB-induzierten Sensitivierung: **A)** Dargestellt ist die Expression des anti-apoptotischen Proteins FLIP<sub>L</sub> und des pro-apoptotischen Proteins Caspase-8, sowie deren Spaltprodukte. Die Melanomzelllinien wurden mit iz-TRAIL (100 ng/ml) und UVB (10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>) einzeln oder in Kombination stimuliert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Rahmen einer Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. **B)** Die Zellen wurden ebenfalls wie unter A beschrieben stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Referenz diente der Lysepuffer. Die Zellen wurden nach 6 h Stimulation lysiert und die Caspase-8-Aktivität in einem Caspase-Assay mittels eines Fluorophor-gekoppelten, spezifischen Caspasesubstrats (Ac-IETD-AMC) ermittelt.



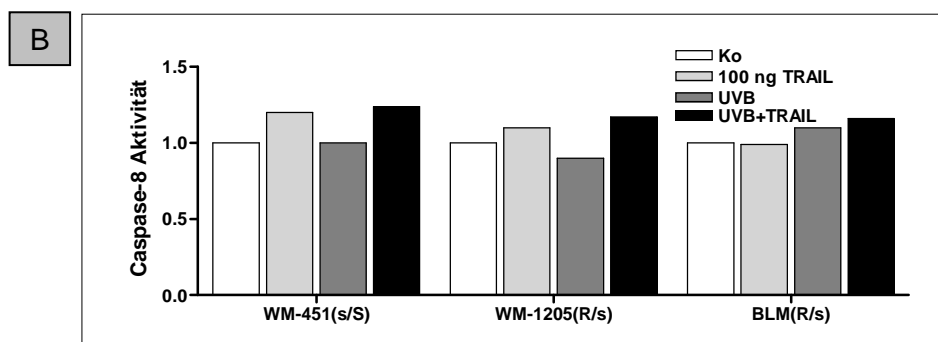
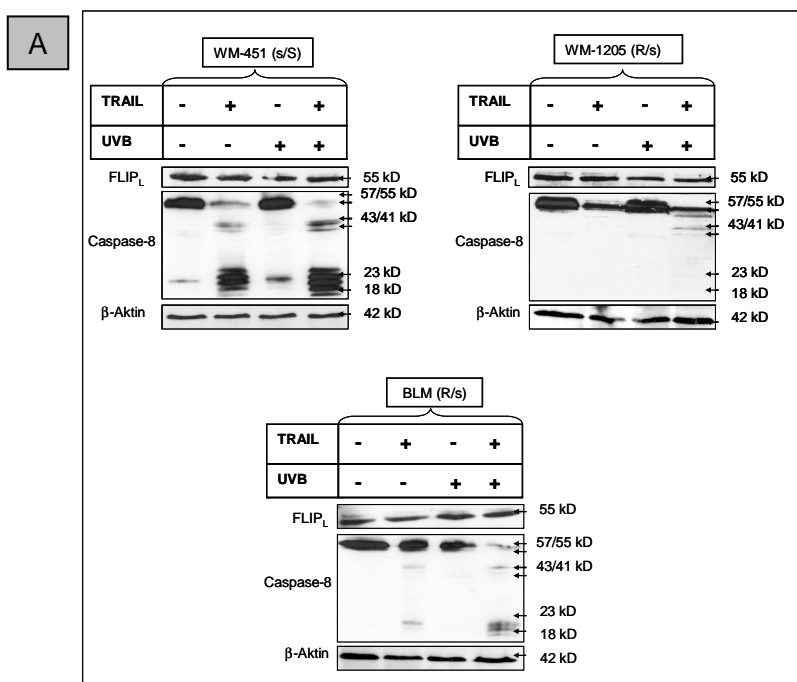
Abbildungsfortsetzung (VGP)



Abbildungsfortsetzung (MM)



## Zelllinien des hoch aggressiven Melanoms (HM)



Abbildungsfortsetzung (HM)

#### 4.5 Die Rolle von Caspase-3 und XIAP in TRAIL-resistenten Melanomzellen

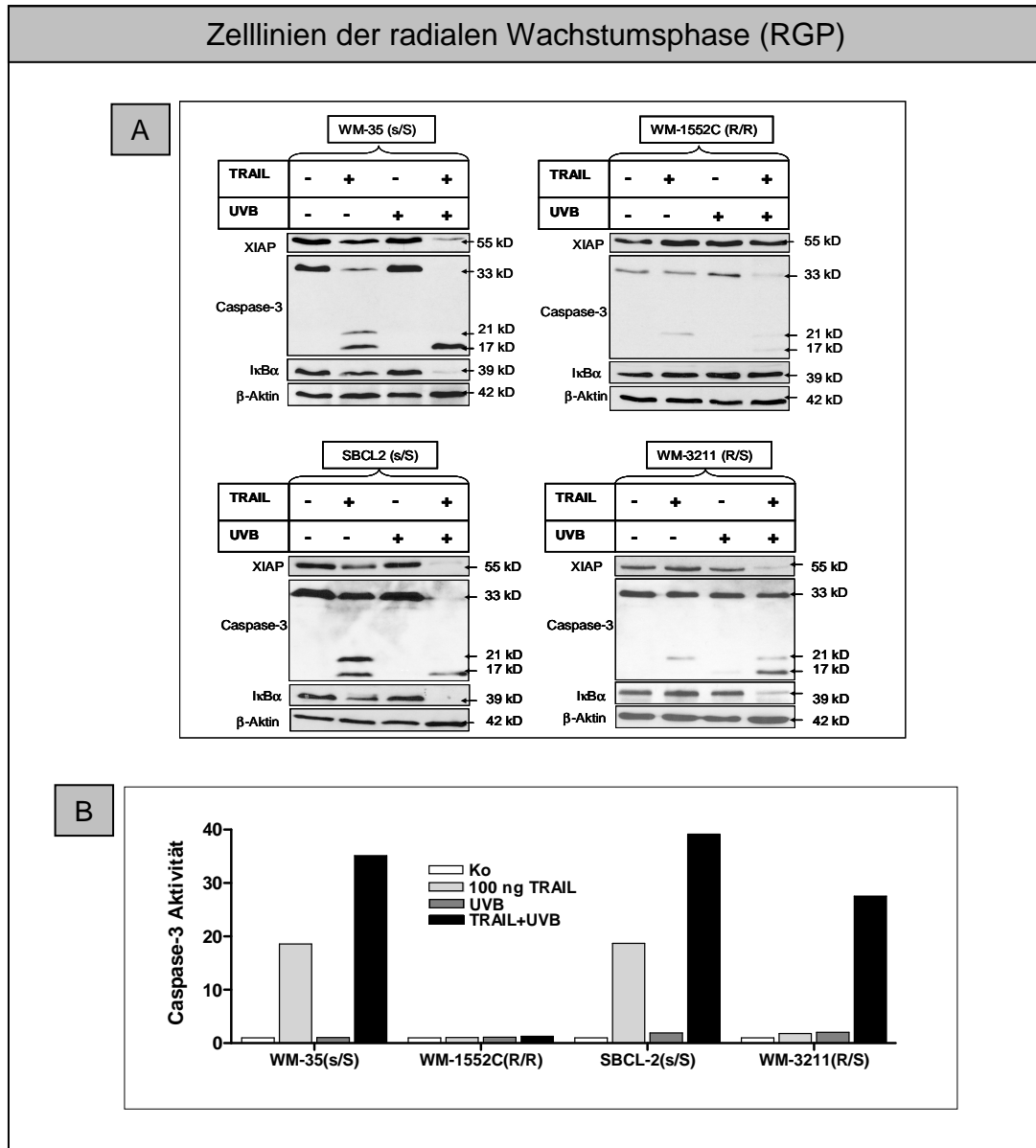
Da die Ergebnisse des basalen XIAP- und Caspase-3-Expressionsmusters bereits Hinweise auf deren Beteiligung an der TRAIL-Suszeptibilität der Melanomzellen ergaben, wurde im folgenden Schritt das Prozessierungsmuster der Caspase-3 im Verhältnis zur XIAP-Expression sowie auch der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung 6 h nach der Stimulation mittels Western-Blot Verfahren untersucht. Auch hier wurde zur Unterstützung der Proteindaten parallel ein Caspase-3 Aktivitätsassay durchgeführt.

Die Ergebnisse der Caspase-3-Prozessierung und des Caspase-Aktivitätsassays, sowie auch der XIAP-Depletion entsprachen dem Apoptoseverhalten der Melanomzellen. So zeigten TRAIL-resistente Zelllinien jeweils gar keine oder nur eine partielle Prozessierung der 33 kD Caspase-3 Proform in das katalytisch inaktive p21 Fragment und eine stabile XIAP Expression (WM-1552C, WM-3211, WM-115, WM-3248, WM-1819, M5, WM-852, MV3, WM-1205, BLM). Die Sensitivierung der Zelllinien durch UVB (alle Zelllinien außer 1552C) ging jeweils mit einer vollständigen Prozessierung (Abb. 4.5.1A) von Caspase-3 in das katalytisch, aktive p17 Fragment und dementsprechend mit einer massiven Steigerung der katalytischen Aktivität einher (Abb. 4.5.1B). Die vollständige Caspase-3-Prozessierung korrelierte jeweils eindeutig mit einer Depletion des spezifischen Inhibitors XIAP.

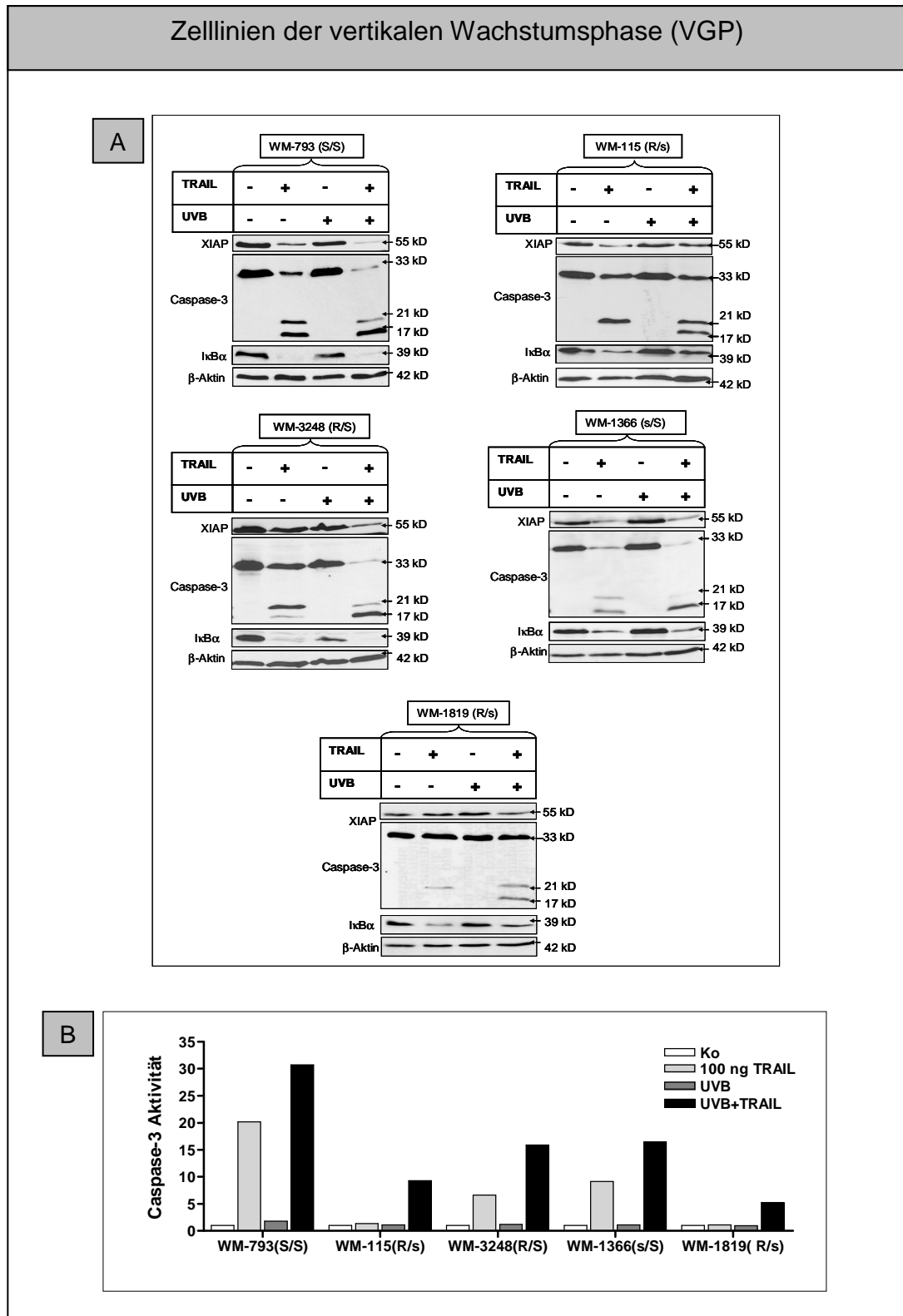
Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass sowohl die TRAIL-Resistenz als auch die UVB-induzierte Sensitivierbarkeit von Melanomzellen auf dem Niveau von Caspase-3 und XIAP begründet wird. UVB-Strahlung alleine induzierte in keiner der Zelllinien eine Degradierung von XIAP oder eine Caspase-Prozessierung oder -Aktivierung, wodurch die Sublethalität der Dosis bestätigt wurde.

Um die Zusammenhänge der NF- $\kappa$ B Aktivierung, der XIAP Expression sowie der TRAIL Sensitivierung näher zu erforschen, wurde die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung mit der XIAP Transkription direkt verglichen. NF- $\kappa$ B wird in unstimulierten Zellen durch den spezifischen Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  zurückgehalten (Maniatis, 1997). Durch die Stimulation kommt es zur I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylierung und somit zur NF- $\kappa$ B Freisetzung. In den Kern transloziertes NF- $\kappa$ B induziert unter anderem die Expression anti-apoptotischer Gene,

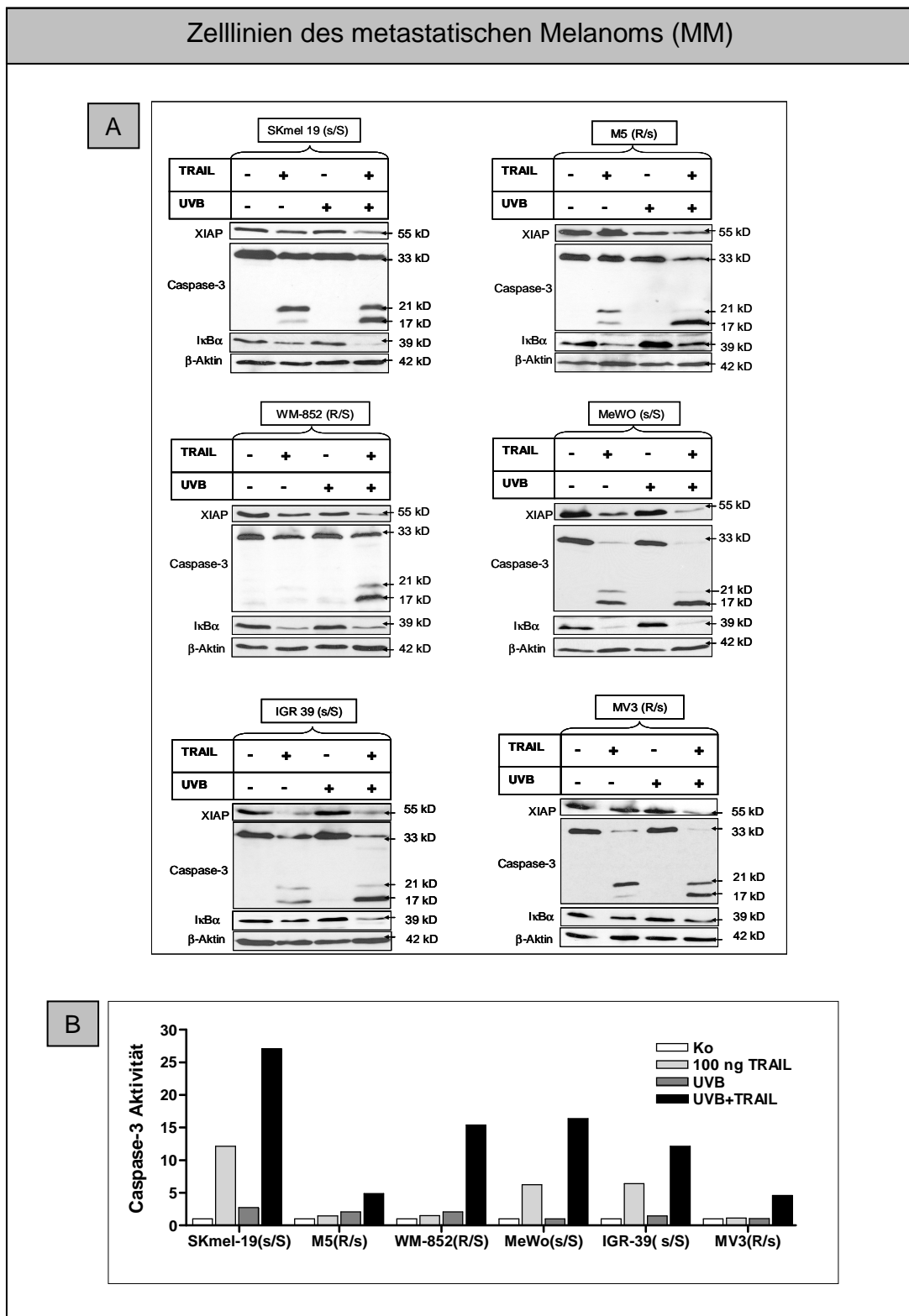
wie die von XIAP und FLIP (Wang et al., 1998; Beg and Baltimore, 1996), sowie die des eigenen Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ .



**Abbildung 4.5.1:** Die Caspase-3-Prozessierung korreliert mit der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und der XIAP Degradierung: **A)** Dargestellt ist die Expression des anti-apoptotischen Proteins XIAP und des pro-apoptotischen Proteins Caspase-3, sowie deren Spaltprodukte. Die Melanomzelllinien wurden mit iz-TRAIL (100 ng/ml) und UVB (10 bzw. 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) einzeln oder in Kombination stimuliert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate durch eine Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. **B)** Die Zellen wurden ebenfalls, wie unter A beschrieben, stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Referenz diente der Lysepuffer. Die Zellen wurden nach 6 h Stimulation lysiert und die Caspase-3-Aktivität in einem Caspase-Assay mittels eines Fluorophor-gekoppelten, spezifischen Caspasesubstrats (Ac-DEVD-AMC) ermittelt.

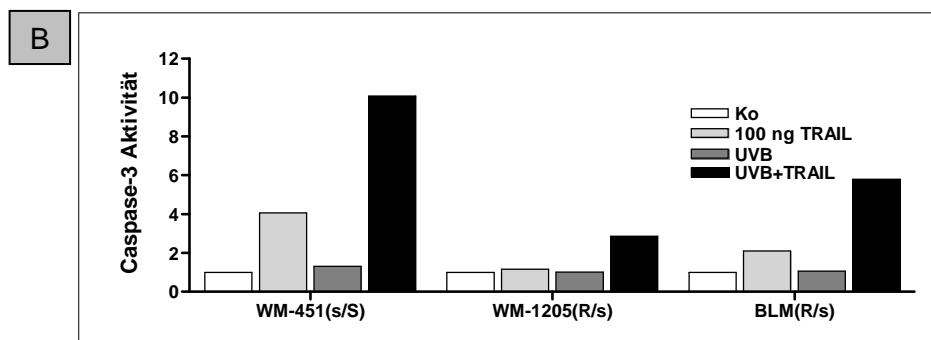
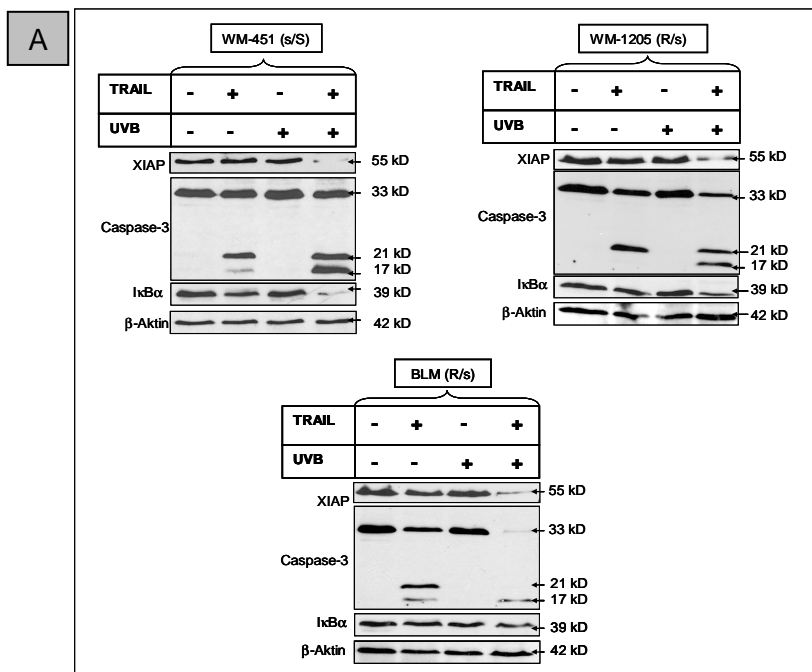


Abbildungsfortsetzung (VGP)



Abbildungsfortsetzung (MM)

## Zelllinien des hoch aggressiven Melanoms (HM)



Abbildungsfortsetzung (HM)

## 4.6 Die transkriptionelle Regulation von XIAP und FLIP

I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung führt allgemein etabliert zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die verstärkte Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  nach der TRAIL und UVB-Kostimulation geht gleichzeitig mit einem verstärkten Rückgang des Caspase-3 Inhibitors XIAP einher (Abb. 4.5.1A). XIAP wiederum ist ein NF- $\kappa$ B transkribiertes Gen. Das gleiche gilt für FLIP, welches auf Proteinebene zum untersuchten Zeitpunkt allerdings nicht reguliert vorliegt. Andererseits konnte für NF- $\kappa$ B eine Konvertierung von einem Aktivator in einen Repressor anti-apoptotischer Gene unter Einfluss von UVB-Strahlung nachgewiesen werden (Pöppelmann et al., 2005). Um den Einfluss der UVB-Kostimulation auf die TRAIL und NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription von FLIP und XIAP zu überprüfen, wurde nach 4-stündiger Stimulation eine RT-PCR durchgeführt.

### 4.6.1 Einfluss der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung, respektive NF- $\kappa$ B-Aktivierung, auf die Expression von XIAP und FLIP

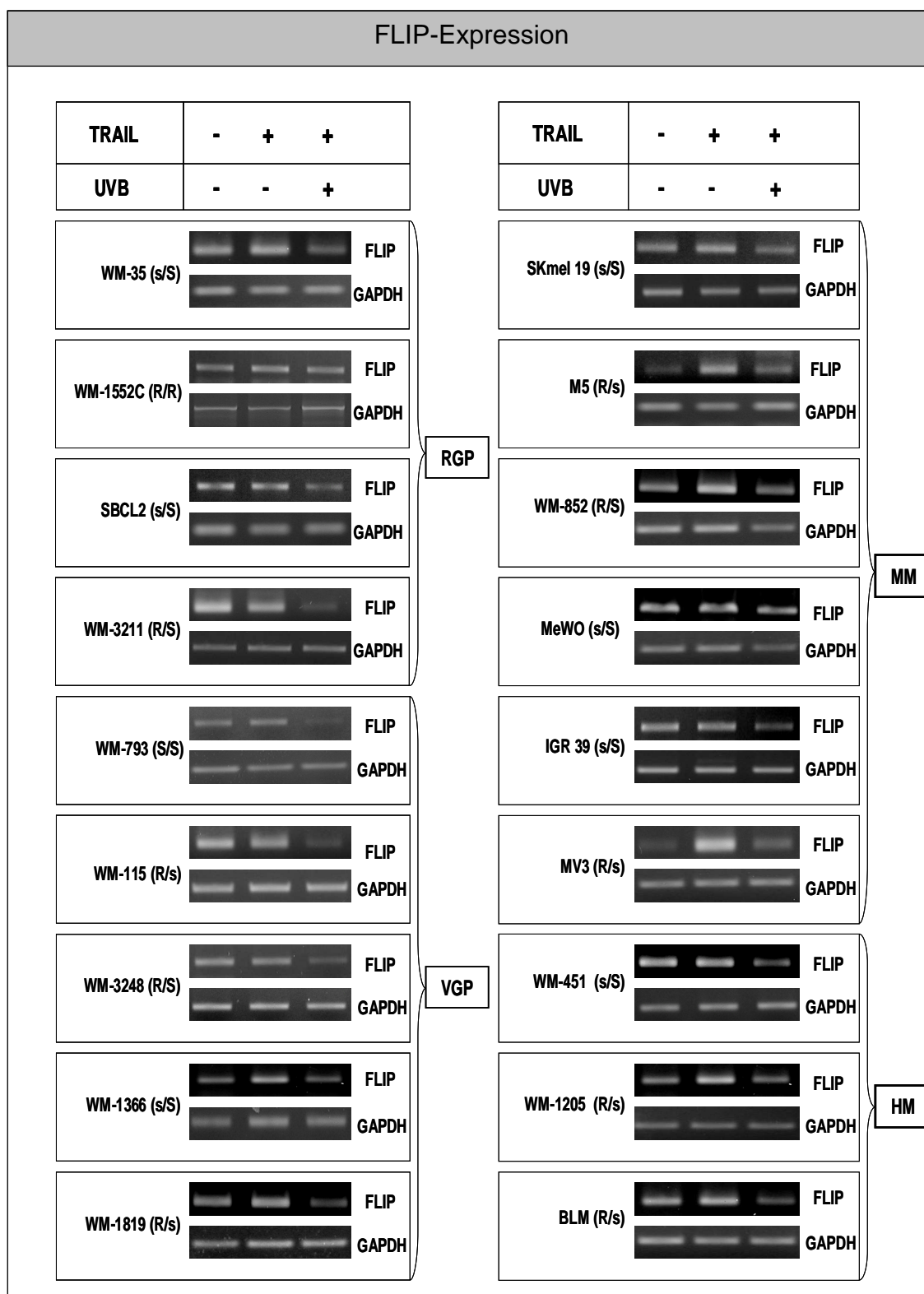
TRAIL alleine induzierte in 15 der 18 Melanomzelllinien eine schwache bzw. eine totale I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung. Lediglich in 3 Zelllinien (WM-1552C, WM-3211, BLM) konnte keine qualitative I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung analysiert werden (Abb. 4.5.1A). Die Melanomzellen zeigten entweder eine konstitutive XIAP-Expression oder FLIP-Expression oder eine sehr geringe bis nicht vorhandene Basalexpression. Die Zelllinien M5 (R/s) und MV3 (R/s) transkribierten basale FLIP mRNA in sehr geringer Menge. Auch das basale mRNA-Level von XIAP war in einigen Zelllinien sehr gering (WM-35(s/S), SBCL-2 (s/S), WM-115 (R/s), WM-852 (R/S), WM-1205 (R/s)). Nach alleiniger TRAIL-Stimulation blieben konstitutive Expressionsniveaus unverändert, während es zu einer gesteigerten mRNA-Expression in Zellen ohne Basalexpression kam (Abb. 4.6.1 (1+2)).

Alle Zelllinien reagierten, unabhängig von dem basalen Expressionsniveau, auf Kostimulation mit UVB mit einer signifikanten Repression der FLIP- und XIAP-Transkription (Abb. 4.6.1 (1+2)). Der Einfluss der UVB-Kostimulation war besonders stark im mRNA-Level von XIAP. Nur hier wurde eine totale Repression nach der Kostimulation festgestellt. Aber obwohl auf der Proteinebene nach 6 h Stimulation keine Depletion von FLIP<sub>L</sub> nach der Kostimulation festgestellt werden konnte (Abb. 4.4.1A),

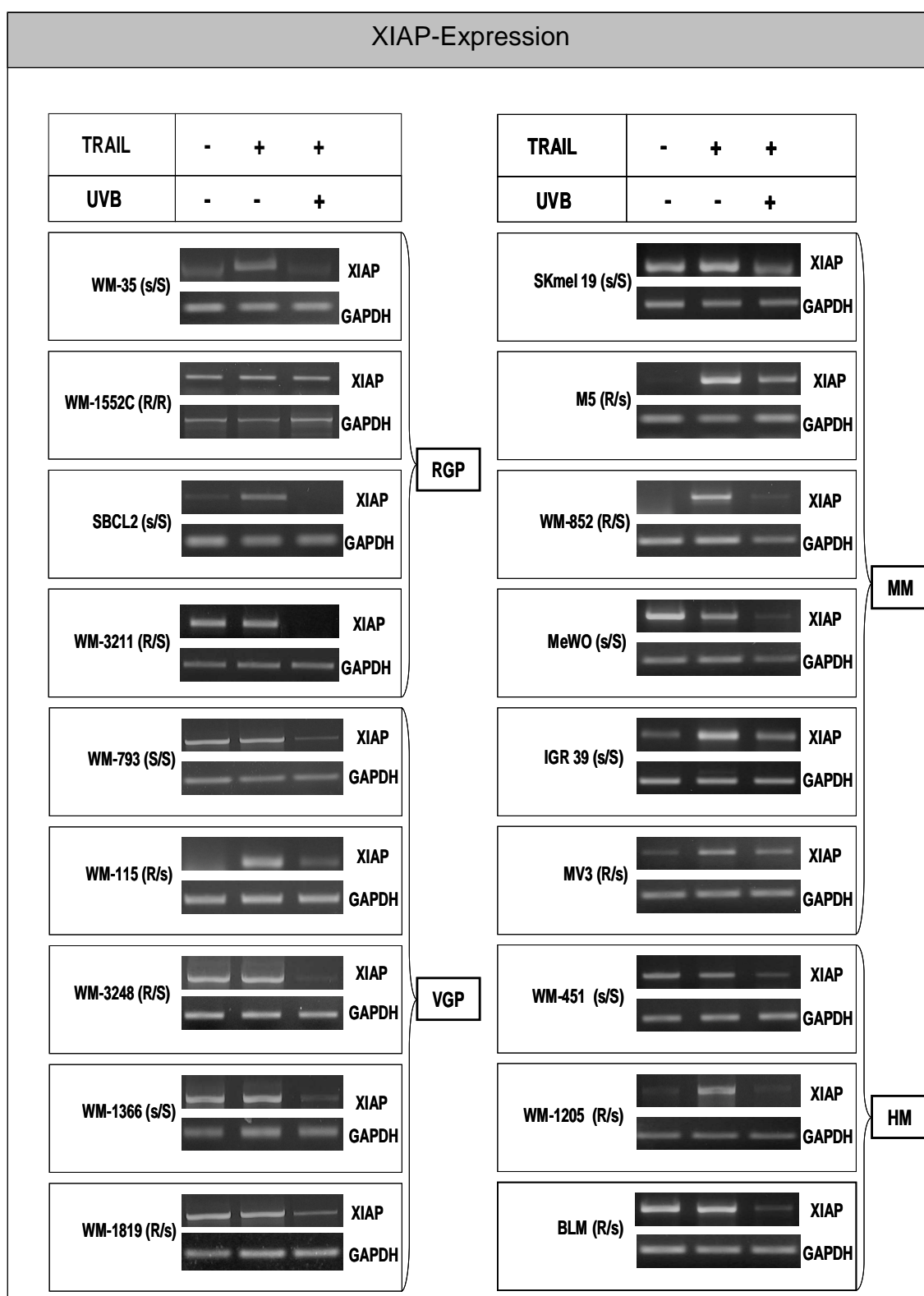
wurde in allen Zelllinien, außer bei der resistenten Zelllinie WM-1552C, eine totale bzw. eine schwache Repression des mRNA-Levels von FLIP dokumentiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Kostimulation mit UVB eine I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung induziert, gefolgt von der NF- $\kappa$ B-abhängigen Repression von XIAP und FLIP auf Transkriptionsebene und eine Depletion von XIAP auf Proteinebene, passend zur TRAIL-Sensibilisierung. Dies deutet auf eine Korrelation zwischen der TRAIL-Sensibilisierung und der XIAP-Repression hin, da in 17 Melanomzelllinien die Repression mit der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung und mit der Sensitivierung der Zellen gegenüber TRAIL einherging. Diese Ergebnisse wurden durch die einzige total resistente Zelllinie WM-1552C ebenfalls bestätigt. Bei dieser konnte weder eine I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung noch eine NF- $\kappa$ B-abhängige Repression von XIAP und FLIP auf Transkriptionsebene festgestellt werden, und somit fand auch keine TRAIL-Sensibilisierung statt.





**Abbildung 4.6.1 (1):** Die Kostimulation mit UVB induziert die Repression des anti-apoptotischen Gens FLIP: Dargestellt sind die Ergebnisse der FLIP RT-PCR. Die Zellen blieben unstimuliert oder wurden mit iz-TRAIL (100 ng/ml) bzw. mit iz-TRAIL und UVB (10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>) stimuliert. Nach 4 h wurde die mRNA isoliert und die Expressionsrate von FLIP mittels semiquantitativer PCR überprüft. GAPDH diente als Expressionskontrolle.



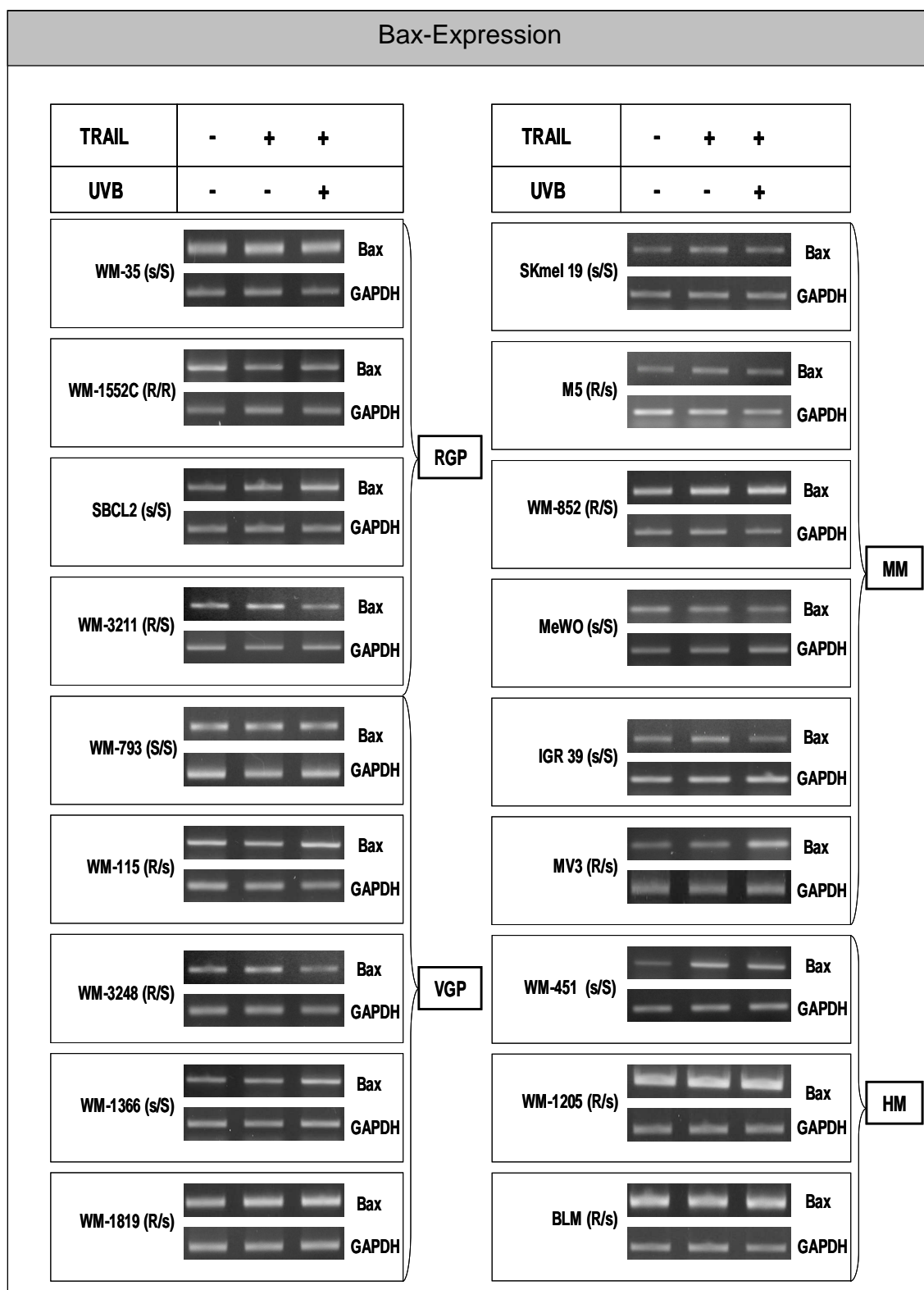
**Abbildung 4.6.1 (2):** Die Kostimulation mit UVB induziert die Repression des anti-apoptotischen Gens XIAP: Dargestellt sind die Ergebnisse der XIAP RT-PCR. Die Zellen blieben unstimuliert oder wurden mit iz-TRAIL (100 ng/ml) bzw. mit iz-TRAIL und UVB (10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>) stimuliert. Nach 4 h wurde die mRNA isoliert und die Expressionsrate von XIAP mittels semiquantitativer PCR überprüft. GAPDH diente als Expressionskontrolle.

## **4.7 Die Beteiligung des intrinsischen Signalweges an der TRAIL-induzierten Apoptose und deren UVB-induzierten Verstärkung**

Das Mitochondrium spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion. In Folge apoptotischer Stimulation transloziert das pro-apoptotische Protein Bax an die Mitochondrienmembran, wo es die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren und damit die Aktivierung der Initiatorcaspase-9 induziert (Belizário et al., 2007).

### **4.7.1 Das Transkriptionsmuster des pro-apoptischen Proteins Bax**

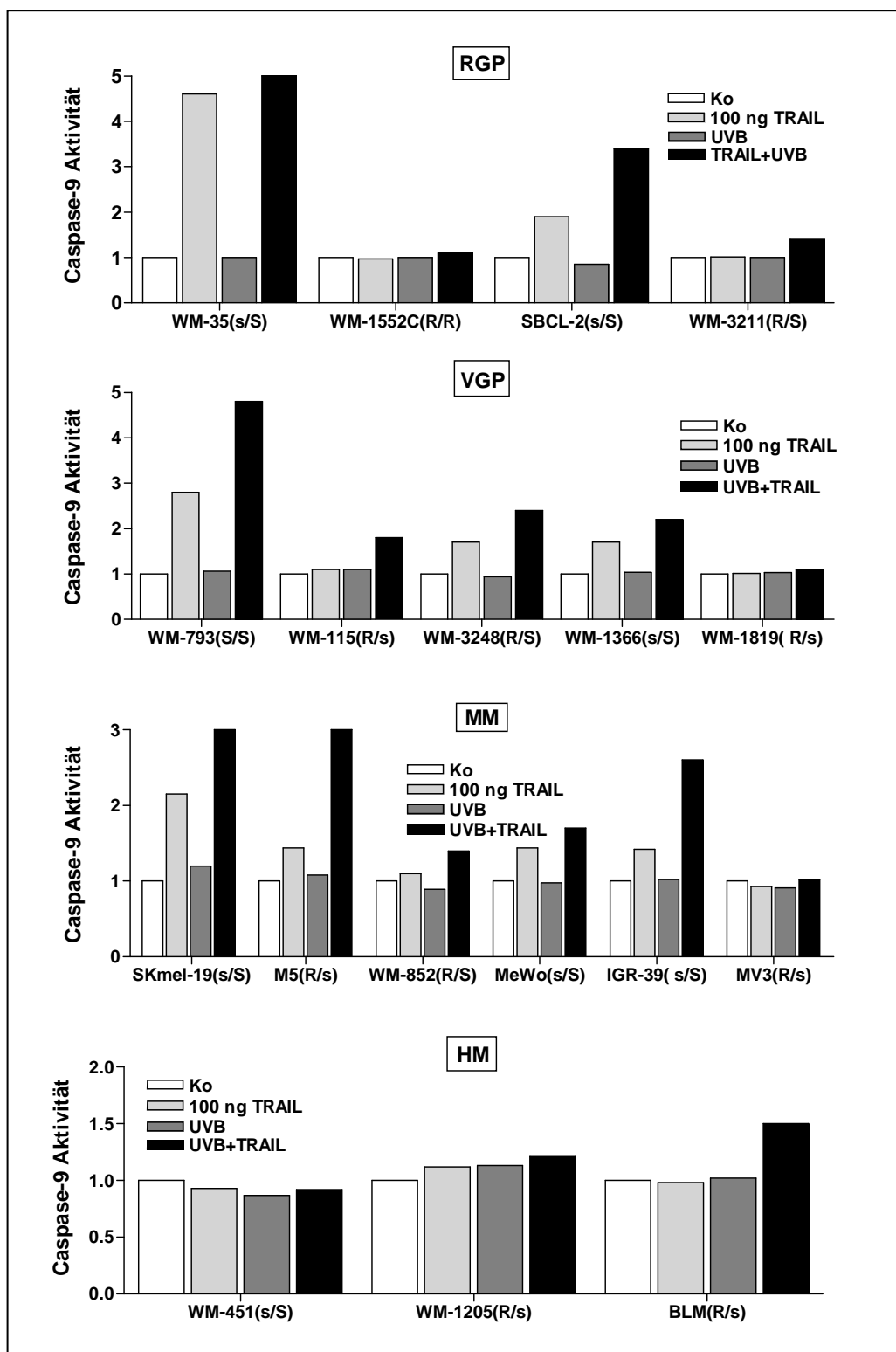
Um zu beweisen, dass die durch UVB vermittelte und mit verstärkter I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung einhergehende XIAP- und FLIP- Repression tatsächlich ein aktiver NF- $\kappa$ B-gesteuerter Prozess ist, wurde die Expression des ebenfalls an der Apoptose beteiligten, aber NF- $\kappa$ B-unabhängig exprimierten Bax-Gens, analysiert. Das Expressionsmuster in der RT-PCR-Analyse blieb durch die Stimulation mit TRAIL und der Kostimulation mit UVB vollkommen unbeeinflusst (Abb. 4.7.1). Dieses Ergebnis weist eindeutig darauf hin, dass die mRNA-Repression von FLIP und XIAP tatsächlich NF- $\kappa$ B-vermittelt ist und es sich nicht um ein allgemeines Phänomen handelt, wie eine UVB-induzierte Verringerung der mRNA Stabilität o.ä.



**Abbildung 4.7.1:** Die Kostimulation mit UVB führt nicht zur Repression des pro-apoptischen Gens Bax: Dargestellt sind die Ergebnisse der Bax RT-PCR. Die Zellen blieben unstimuliert oder wurden mit iz-TRAIL (100 ng/ml) bzw. mit iz-TRAIL und UVB (10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>) stimuliert. Nach 4 h wurde die mRNA isoliert und die Expressionsrate von Bax mittels semiquantitativer PCR überprüft. GAPDH diente als Expressionskontrolle.

#### 4.7.2 Die Bestimmung der Caspase-9-Aktivität

Um auszuschließen, dass die verstärkte Caspase-3-Prozessierung und -Aktivierung durch Caspase-9-Aktivierung verursacht wird, wurde ein Caspase-9-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Die Caspase-9 Aktivität korrelierte mit dem Apoptoseverhalten fast aller Melanomzelllinien. In 3 der 18 Zelllinien wurde eine signifikante, in 6 lediglich eine marginale Erhöhung der Caspaseaktivität nach alleiniger TRAIL-Stimulation analysiert. In 16 der 18 Zelllinien wurde nach der UVB-Kostimulation ebenfalls eine schwache oder moderate Erhöhung (WM-35 (s/S), SBCL-2 (s/S), WM-793 (S/S), WM-3248 (R/S), Skmel-19 (s/S), M5 (R/s), IGR-39 (s/S)) der Caspase-9 Aktivität detektiert, passend zur TRAIL-Suszeptibilität (Abb. 4.7.2). Insgesamt war die Aktivität der Caspase-9 so niedrig wie die von Caspase-8 (Abb. 4.4.1B). Lediglich die Caspase-3 wies eine massive Aktivitätserhöhung durch UVB-Kostimulation auf (Abb. 4.5.1B). Diese Daten zeigen, analog zu denen mit Caspase-8, dass für die verstärkte Caspase-3-Prozessierung und Aktivierung „upstream“ Caspasen nicht zuständig sind, sondern dass andere Mechanismen – wie eine differentielle XIAP-Regulierung – essentieller sind.



**Abbildung 4.7.2:** Die Aktivität der Caspase-9 ist so niedrig wie die von Caspase-8: Messung der Caspase-9-Aktivität nach 6-stündiger Stimulation mit jeweils iz-TRAIL (100 ng/ml), UVB (10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>) oder der Kostimulation von TRAIL mit UVB. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Referenz diente der Lysepuffer. Die Zellen wurden nach 6 h Stimulation lysiert und die Caspase-3-Aktivität in einem Caspase-Aktivitäts-Assay mittels eines Fluorophor-gekoppelten, spezifischen Caspasesubstrats (Ac-LEHD-AMC) ermittelt.

## 4.8 Untersuchung des NF- $\kappa$ B-regulierten, anti-apoptotischen XIAP Proteins

Das Prozessierungs- und Expressionsmuster des anti-apoptotischen XIAP Proteins bestätigt eindeutig den Einfluss von XIAP auf die TRAIL-Sensibilisierung der Melanomzellen. Die nächste zu klärende Frage war, ob die tatsächlich NF- $\kappa$ B-abhängige, transkriptionelle Repression für die verstärkte Depletion des zellulären Gesamtproteingehaltes von XIAP verantwortlich ist. Dafür wurden 4 verschiedenen Zelllinien (WM-3211 (RGP), WM-115 (VGP), MV3 (MM), BLM (HM)), die die verschiedenen Tumorprogressionsstadien repräsentieren, detaillierter untersucht. Dabei handelte es sich jeweils um Melanomzelllinien, die TRAIL-resistent waren, aber durch Kostimulation mit UVB sensibilisiert werden konnten. Zunächst wurde die NF- $\kappa$ B-abhängige XIAP-Repression auf die TRAIL- und UVB-induzierte Apoptoserate bzw. auf die Depletierungsrate von endogenem und ektopisch exprimiertem XIAP mittels Western-Blot-Verfahren dokumentiert.

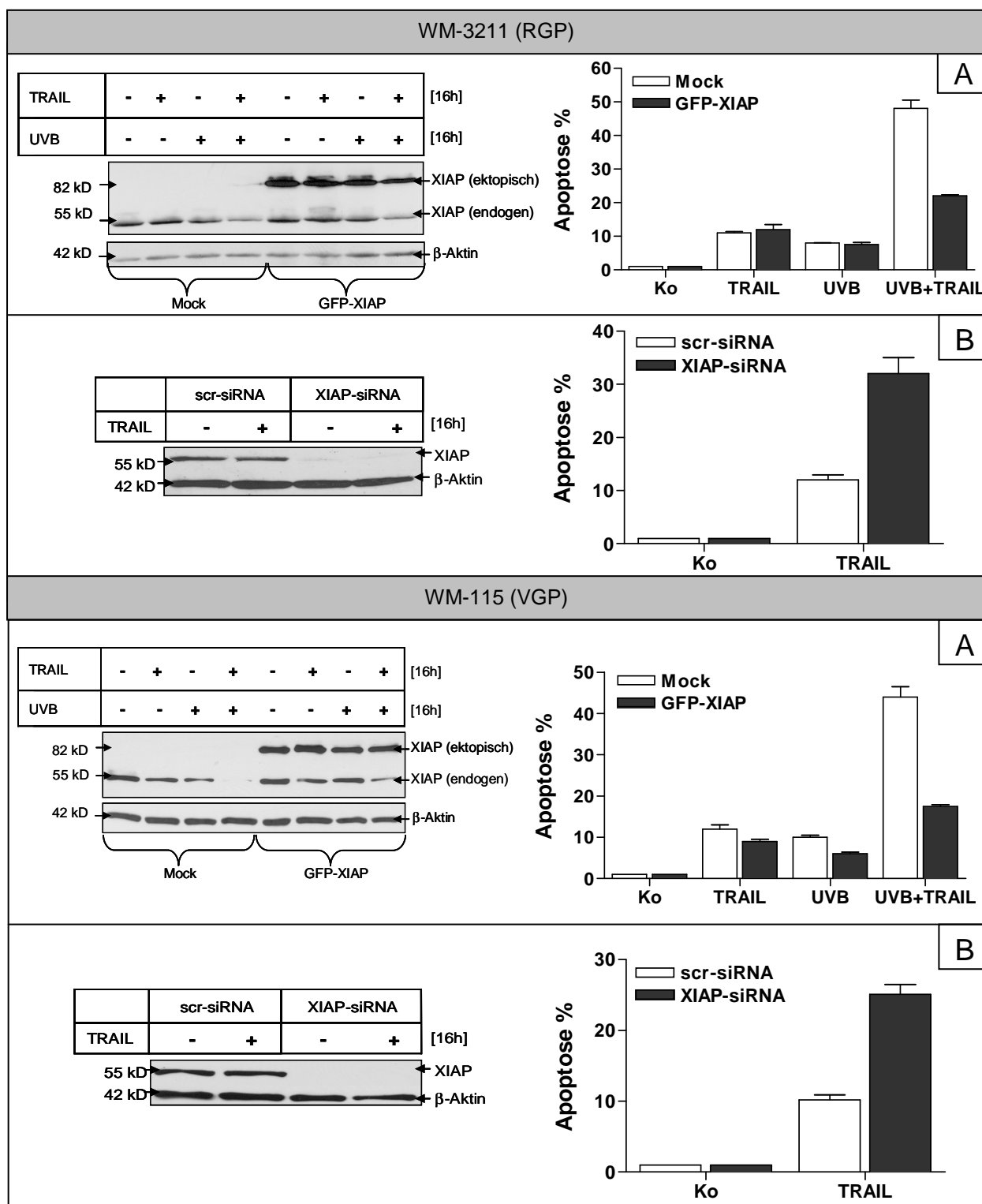
### 4.8.1 Einfluss der XIAP-Überexpression bzw. „*knock-down*“ auf die TRAIL-Resistenz

Die Melanomzelllinien wurden mit einem GFP-XIAP-Fusionsprotein bzw. mit einem Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h mit TRAIL, UVB oder einer Kombination aus beiden für jeweils 16 h stimuliert, und die Proteinextrakte in Western-Blot-Analysen verglichen. Die Apoptoserate wurde in einem *Cell Death Detection* ELISA ermittelt. In allen 4 Zelllinien wurde eine signifikante Herunterregulierung des endogenen XIAP nach UVB-Kostimulation festgestellt. Dagegen wurde das ektopische XIAP eindeutig geringer depletiert, da der virale Promotor konstitutiv XIAP exprimiert. Diese starke Depletion von endogenem XIAP weist auf eine zusätzliche Beteiligung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Repression der XIAP Synthese hin, die somit zu einer verstärkten Abnahme des zellulären Gesamtproteingehaltes an XIAP beiträgt. Die Zelllinien (WM-3211, WM-115, MV3, BLM), bei denen GFP-XIAP überexprimiert wurde, zeigten eine eindeutig verstärkte Resistenz gegenüber der TRAIL und UVB-Kostimulation im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (Abb. 4.8.1A). Die Apoptoserate nahm im Durchschnitt um 25% ab.

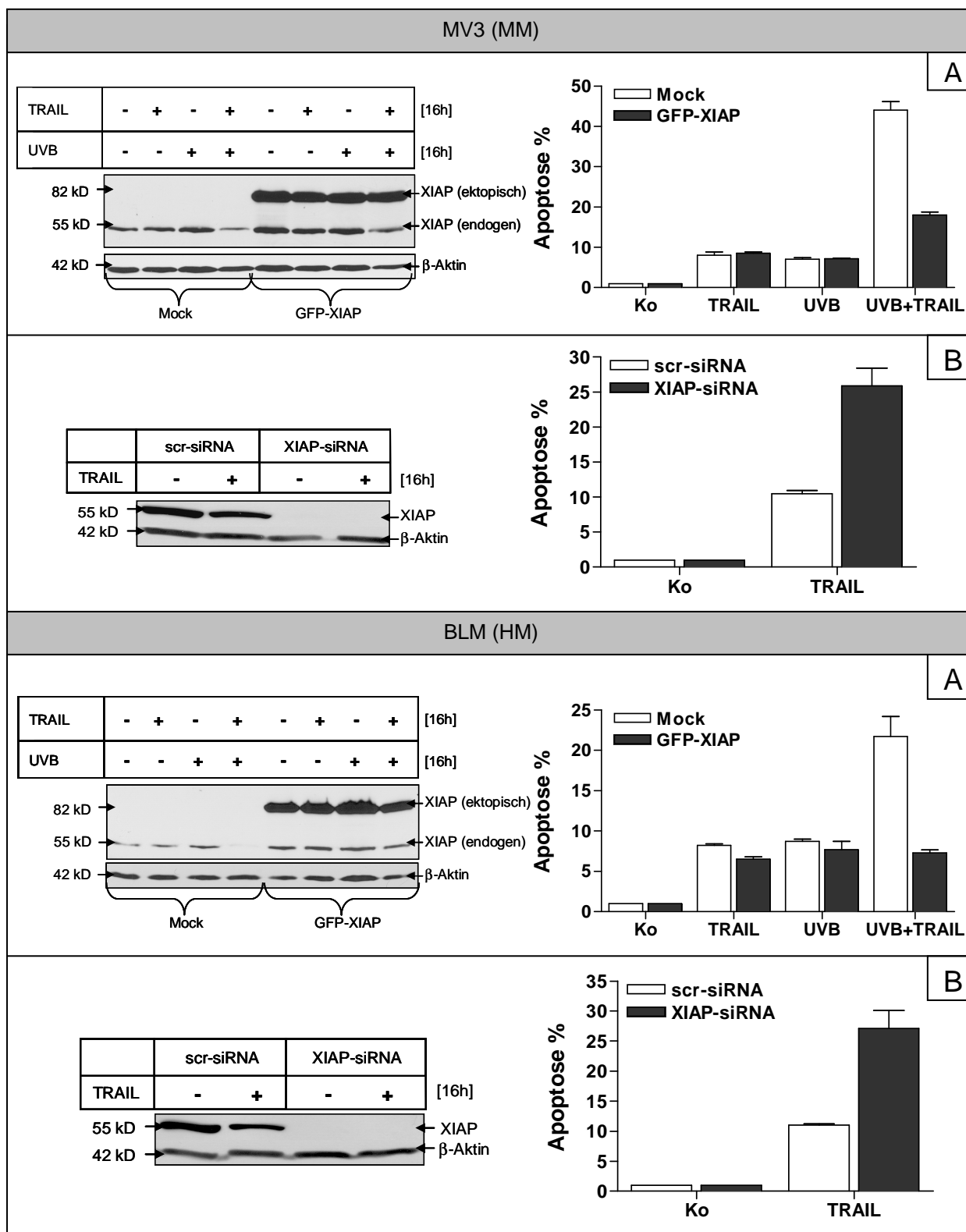
Mittels „*knock-down*“ von XIAP wurde die entscheidende Rolle von XIAP bei der Vermittlung der Apoptose-Resistenz erneut bestätigt. Dafür wurden alle 4 Melanomzelllinien mit XIAP-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 h (WM-115) bzw. 72 h (MV3, BLM, WM-3211) wurden sie für 16 h mit TRAIL stimuliert. Es wurde in allen 4 Zelllinien ein Anstieg der Apoptoserate nach alleiniger TRAIL-Stimulation festgestellt. Durch die Western-Blot-Analyse wurde der erfolgreiche XIAP „*knock-down*“ bei allen 4 Melanomzelllinien dokumentiert. Vor allem die Tatsache, dass in den Kontrollzellen (scr-siRNA) tatsächlich keine XIAP-Degradierung nach der TRAIL-Stimulation zustande kam, bekräftigt die Reproduzierbarkeit der Daten (Abb. 4.8.1B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die XIAP-Überexpression, die TRAIL Resistenz und ein „*knock-down*“ von XIAP eine starke TRAIL-Sensitivierung induziert.





**Abbildung 4.8.1:** **A)** XIAP-Überexpression induziert Resistenz der Melanomzelllinien: Überprüfung der Depletion des endogenen und ektopisch exprimierten XIAP-Proteins. Die Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (Mock = pEGFP-C1) oder mit dem GFP-XIAP kodierendem Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion blieben die Zellen unstimuliert oder wurden für 16 h mit iz-TRAIL (100 ng/ml) und UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) allein oder in Kombination stimuliert. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin. **B)** Der „knock-down“ von XIAP erhöhte die apoptotische Antwort der Zellen auf die TRAIL-Stimulation: Als Transfektionskontrolle dienten Zellen, die mit einer „scrambled“ siRNA transfiziert worden waren. 72 h nach der XIAP-siRNA Transfektion erfolgte die iz-TRAIL Stimulation (100 ng/ml), und nach 16 h wurde die Apoptoserate ermittelt.

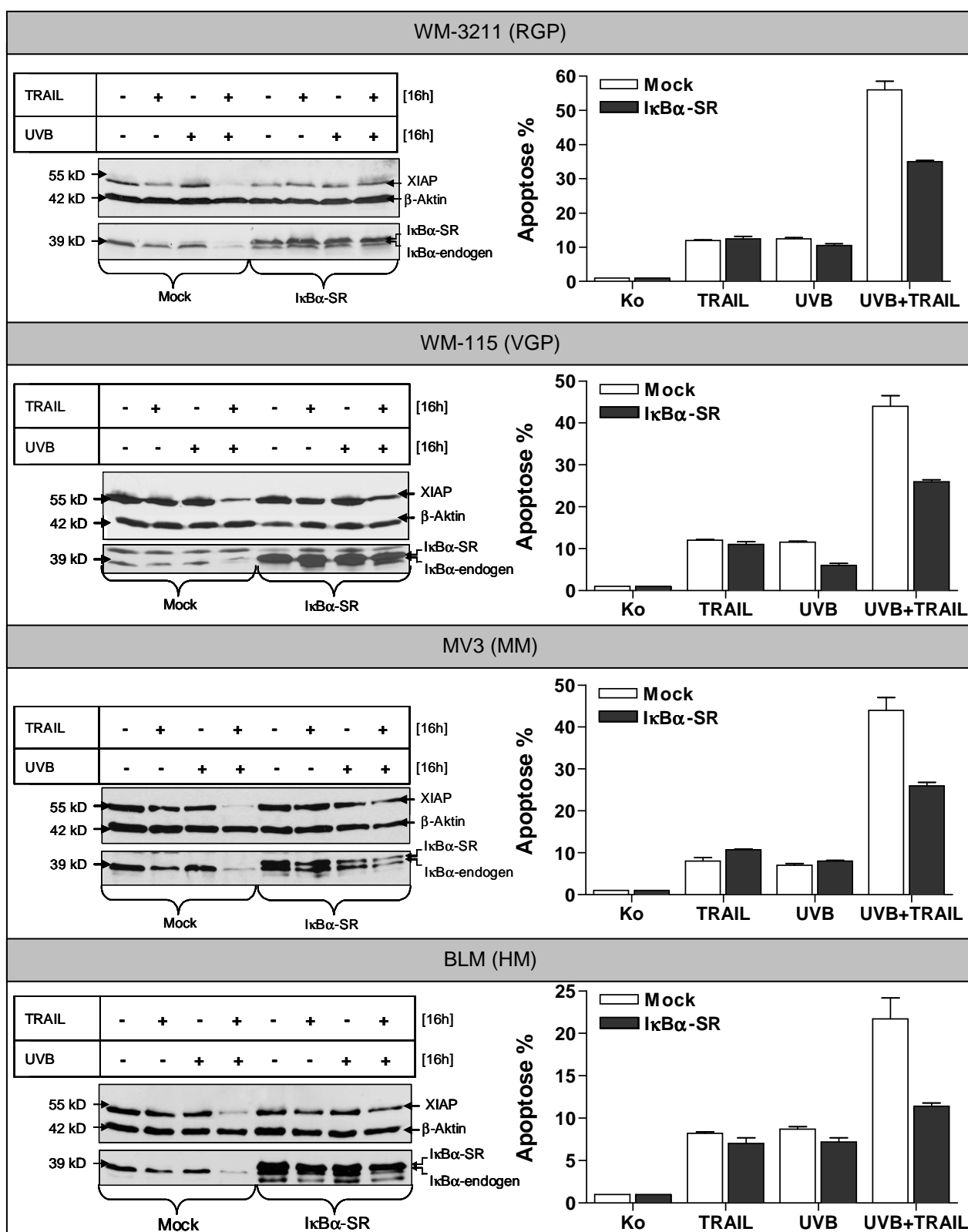


Abbildungsfortsetzung

#### 4.8.2 Auswirkungen der Inhibierung von I $\kappa$ B $\alpha$

Letztendlich sollte die ausschlaggebende, regulierende Wirkung von NF- $\kappa$ B auf die verstärkte XIAP-Depletion bestätigt werden. Dafür wurden alle 4 Melanomzelllinien mit dem I $\kappa$ B $\alpha$ -Super-Repressor (I $\kappa$ B $\alpha$ -SR) transfiziert. Bei I $\kappa$ B $\alpha$ -SR wurden die beiden Serinreste an Position 32/36 gegen Alanin ausgetauscht, wodurch dieses nicht mehr phosphoryliert und das Protein nicht mehr degradiert werden kann. I $\kappa$ B $\alpha$ -SR sollte somit als kompetitiver Bindungspartner für NF- $\kappa$ B in der Zelle dienen und dessen Freisetzung und Aktivierung verhindern. Somit würde die Verhinderung der NF- $\kappa$ B vermittelten XIAP-Repression der Apoptose entgegenwirken. 24 h nach der Transfektion (I $\kappa$ B $\alpha$ -SR) wurden die Zelllinien (WM-3211, WM-115, MV3, BLM) mit TRAIL, UVB oder einer Kombination aus beiden für jeweils 16 h stimuliert, die Apoptoserate mittels „*Cell Death Detection* ELISA“ analysiert und in Proteinextrakten der I $\kappa$ B $\alpha$ - und XIAP- Status parallel ermittelt. Alle 4 Melanomzelllinien, in denen I $\kappa$ B $\alpha$ -SR überexprimiert wurde, zeigten im *Cell Death Detection* ELISA eine signifikante Senkung der Apoptoserate nach Kostimulation mit UVB. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls in der Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden, konnte in den I $\kappa$ B $\alpha$ -SR-transfizierten Zellen lediglich eine schwache XIAP-Depletion dokumentiert werden (Abb. 4.8.2).

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass die NF- $\kappa$ B abhängige, transkriptionale Repression zu einer verstärkten Depletion des zellulären Gesamtproteingehaltes von XIAP und somit zur TRAIL-Sensibilisierung der Melanomzelllinien beiträgt.



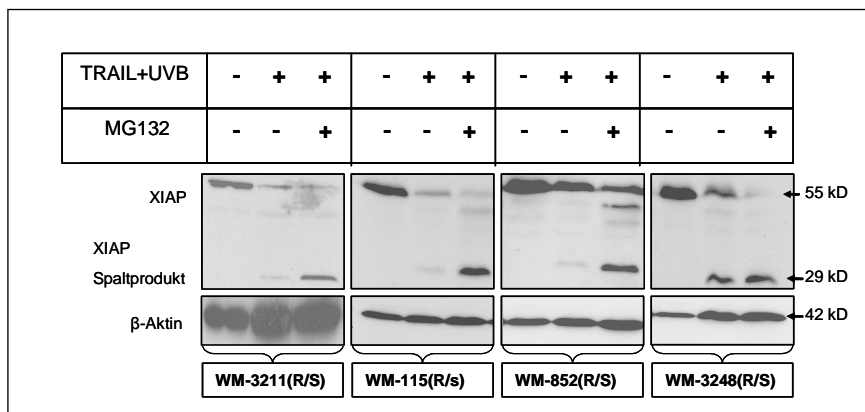
**Abbildung 4.8.2:** IκBα-SR-Überexpression induziert eine signifikante Senkung der Apoptoserate: Die Zellen wurden mit einem leeren Vektor (Mock = pEGFP-C1) oder mit einem Plasmid transfiziert, auf welchem IκBα-SR kodiert war. 24 h später blieben die Zellen unstimuliert oder wurden für 16 h mit iz-TRAIL (100 ng/ml), UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) oder mit TRAIL und UVB stimuliert und danach die Apoptose bestimmt. Die Apoptoserate wurden in einem „Cell Death Detection ELISA“ ausgewertet. Die verbleibenden Zellen wurden lysiert und die Überexpression durch eine Western-Blot-Analyse überprüft. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

#### 4.9 Die proteasomale Degradierung von XIAP

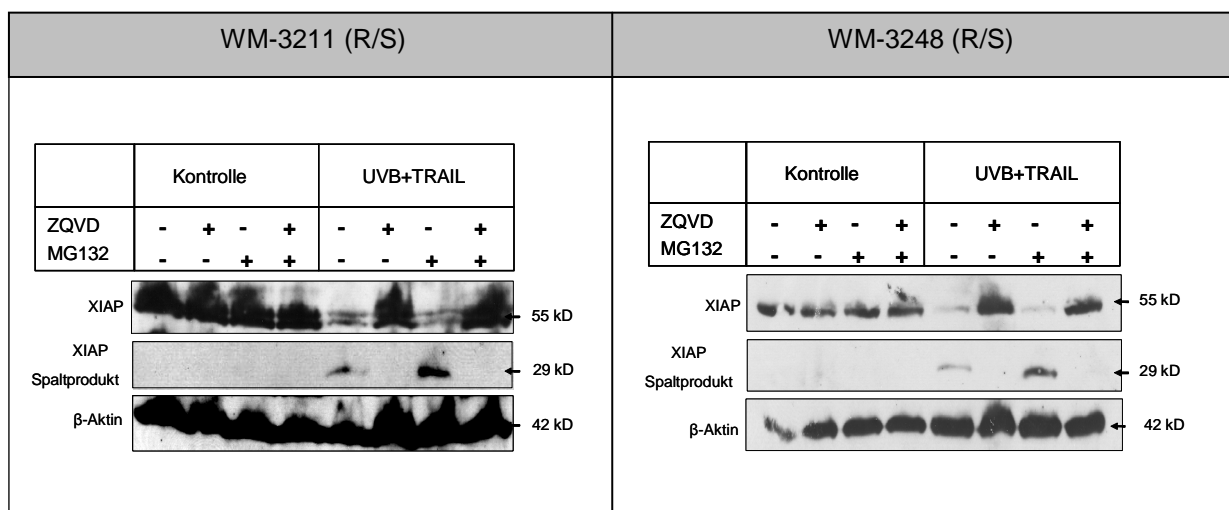
Nachdem festgestellt wurde, dass die XIAP-Depletion die entscheidende Rolle in der TRAIL-Sensitivisierung spielt, wurde dieses Phänomen näher betrachtet. Durch die Induktion der Apoptose kommt es ebenfalls zur Depletion an viral exprimiertem XIAP. Dieser Mechanismus ist laut Literatur vermutlich an die proteasomale Degradierung von XIAP gekoppelt (Yang & Li, 2000). Diese potentielle, Proteasom gesteuerte XIAP-Degradierung wurde im Detail in 4 zufällig ausgewählten, unterschiedlichen Melanomzelllinien (WM-3211, WM-115, WM-852, WM-3248) untersucht.

Die Zellen wurden vor der Kostimulation mit iz-TRAIL (100 ng/ml) und UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) 30 min. lang mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 präinkubiert. Die XIAP-Degradierung wurde danach mittels Western-Blot analysiert. Die Proteasom-Inhibierung führte in allen 4 Zelllinien nicht zum Erhalt der 55 kD XIAP Bande, sondern lediglich zur Stabilisierung einer 29 kD großen, trunkierten XIAP-Variante (Abb. 4.9.1). Dieses Ergebnis deutet auf eine proteolytische Prozessierung hin, die der proteasomalen Degradierung von XIAP vorausgehen muss. Um zu überprüfen, ob es sich bei der verantwortlichen Protease eventuell um eine Caspase handeln könnte, wurden die Zelllinien WM-3211 und WM-3248 vor der 16-stündigen Kostimulation (TRAIL + UVB) entweder mit dem proteasomalen Inhibitor MG132, dem umfassenden Caspase-Inhibitor zQVD oder einer Kombination aus beiden stimuliert. Die trunkierte Variante (29 kD) des XIAP Proteins wurde in geringem Maße in beiden kostimulierten Zelllinien (WM-3211 und WM-3248) detektiert, die keinen der Inhibitoren (MG132, zQVD) enthielten. In Zellen, die nur mit MG132 stimuliert wurden, wurde das XIAP-Spaltprodukt (29 kD) offensichtlich stabilisiert (Abb. 4.9.2). Die Caspase-Inhibierung durch zQVD und konsequenter Weise auch die zusätzliche Proteasom-Inhibition (MG132) führte hingegen zum Erhalt des vollständigen XIAP Proteins (55 kD).

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Caspase-vermittelte, proteolytische Spaltung von XIAP eine Voraussetzung für dessen anschließende, vollständige Eliminierung durch proteasomale Degradierung ist.



**Abbildung 4.9.1:** Die XIAP-Degradierung ist kein rein proteasomaler Prozess. Die Zelllinien (WM-3211, WM-115, WM-852 und WM-3248) wurden 30 min. mit MG132 (20  $\mu$ M) präinkubiert und anschließend für 6 h mit UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) und iz-TRAIL (100 ng/ml) kostimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, sowie kostimulierte Zellen ohne Zusatz von MG132. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate durch eine Western-Blot-Analyse mittels XIAP Antikörper analysiert. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin.



**Abbildung 4.9.2:** Caspase-Inhibierung (zQVD) verhindert die XIAP-Spaltung: Die Zelllinien WM-3211 (entnommen aus der Diplomarbeit von Alexandra Kunz) und WM-3248 wurden 30 min. vor der Stimulation entweder mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (20  $\mu$ M), dem Caspase-Inhibitor zQVD (20  $\mu$ M) oder einer Kombination aus beiden präinkubiert. Anschließend blieben die Zellen unstimuliert oder wurden mit iz-TRAIL (100 ng/ml) und UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) kostimuliert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte durch eine Western-Blot-Analyse mittels XIAP-Antikörper analysiert. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin

## V. Diskussion

Das Melanom gehört zu den Krebsarten, die tödlich enden können und bei denen die herkömmliche konventionelle Chemotherapie nicht mehr anspricht (Soengas et al., 2001). TRAIL ist in der Lage, über die Trimerisierung der Todesrezeptoren und der damit verbundenen Auslösung einer Signal-Kaskade die Apoptose zu induzieren (Locksley et al., 2001; Denecker et al., 2001). Im Gegensatz zu den anderen TNF-Familienmitgliedern induziert TRAIL die Apoptose selektiv in Tumorzellen (Wiley et al., 1995). Die Tatsache, dass sich primäre Melanozyten selbst gegenüber hohen TRAIL Konzentrationen resistent verhalten, unterstützt die bereits bekannte Tumorselektivität von TRAIL und rechtfertigt somit dessen Einsatz als potentielleres Krebstherapeutikum (Walczak et al., 1999). Seit Jahren ist allerdings bekannt, dass eine Vielzahl von Tumorzellen, darunter auch ein beträchtlicher Teil von Melanomzelllinien, resistent gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose sind, was ein großes Problem bei der Entwicklung effizienter Krebstherapien darstellt (Grotzer et al., 2000; Hopkins et al., 2000; Griffith et al., 1998a; Merino et al., 2007). In einigen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die TRAIL-induzierte Apoptose durch zusätzliche Stimulation mit anderen Apoptose-auslösenden Agenzien, wie Chemotherapeutika oder ionisierender Strahlung, synergistisch gesteigert werden kann (Dejosez M et al., 2000; Lacour S., 2001; Kim M. et al., 2001). Solche Kombinationstherapien sind somit für eine erfolgreiche Krebstherapie von großer Bedeutung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Barriere der TRAIL-Resistenz auch durch UVB-Strahlungen hoch synergistisch durchbrochen werden kann (Zeise et al., 2004; Kim SC et al., 2007). Diese Kombinationstherapie ist von großer Bedeutung, da UVB-Bestrahlung im Vergleich zu anderen Apoptose-auslösenden Agenzien die geringsten, unerwünschten Nebenwirkungen für den Organismus besitzt.

Die Analyse von 18 Melanomzelllinien definierter Tumorprogressionsstadien auf ihre Suszeptibilität gegenüber TRAIL bzw. einer Stimulation mit TRAIL und UVB-Strahlung zeigten eindeutig, dass die Reaktivität der Melanomzelllinien in keinster Weise mit dem jeweiligen Tumorprogressionsstadium korrelierte. In allen Stadien waren unselektiv sowohl TRAIL-resistente als auch TRAIL-sensitive Zelllinien vertreten. Von den in dieser Arbeit untersuchten 18 Melanomzelllinien waren lediglich 8 TRAIL-sensitiv. In 10 Melanomzelllinien reichte eine alleinige Stimulation mit 100 ng/ml TRAIL nicht für die

Induktion der Apoptose aus. Durch die Kombination von TRAIL mit einer sublethalen UVB-Dosis, einer Dosis die also allein nicht zur Induktion des Zelltodes in der Lage ist, konnten jedoch 9 der 10 resistenten Melanomzelllinien synergistisch gegenüber TRAIL sensitiviert werden. Die apoptotische Antwort initial sensitiver Zelllinien wurde signifikant verstärkt. Dies zeigte, dass nicht die molekularen Veränderungen, die während der Melanomprogression stattfinden für die TRAIL-Resistenz verantwortlich zu machen sind, sondern dass dieser Resistenz ein ubiquitärer molekularer Mechanismus zugrunde liegen muss.

Auch das Verhalten der Melanomzelllinien gegenüber dem agonistischen Fas-AK ist analog. Allerdings induzierte der Fas-Agonist nur in 2 Zelllinien die Apoptose. Durch die sublethale UVB-Strahlung konnten bis auf 4 Zelllinien alle gegenüber der Fas-induzierten Apoptose sensibilisiert werden. Der Fas-Agonist hat folglich im Vergleich zu TRAIL einen schwächeren Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Melanomzelllinien. Folglich kann hier allgemein von einer stark eingeschränkten Suszeptibilität von Melanomzelllinien gegenüber der Todesligand-induzierten Apoptose, sowie auch von einer allgemeingültigen synergistischen Sensitivierbarkeit durch zusätzliche Bestrahlung mit sublethalen UVB-Dosen gesprochen werden. Auch wenn UVB in der Lage, war die TRAIL resistenten Zelllinien zu sensibilisieren, kann UVB aufgrund seiner niedrigen Eindringtiefe nur zur Behandlung von kutanen Melanomen, nicht aber bei bereits metastasierenden Melanomen eingesetzt werden. Dies führte zur Untersuchung einer möglichen Therapie mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin. Stallone et al. postulierte eine Regression der kutanen Kaposi-Sarkom Läsionen in Patienten nach 3-monatiger Rapamycin Behandlung (Stallone et al., 2005). Rapamycin induziert eine Hemmung der Tumor-Angiogenese durch verminderte Freisetzung des Gefäßendothel-Wachstumsfaktors (VEGF) und einer direkten Proliferationshemmung der Tumorzellen (Guba et al., 2002). In Verbindung mit Sorafenib, einem Kinaseinhibitor, induzierte Rapamycin doppelt so viel Apoptose, wohingegen Sorafenib alleine nur halb so effizient war (Lasithiotakis et al., 2008). Zusätzlich zeigten frühere Studien bereits, dass Rapamycin in der Lage ist, TRAIL-resistente Tumorzelllinien durch die Herunterregulierung des anti-apoptotischen Proteins FLIP zu sensibilisieren (Panner et al., 2005). In der vorliegenden Studie konnte dieser Sachverhalt allerdings nicht bestätigt werden, da lediglich in 3 Melanomzelllinien eine nur moderate Steigerung der Apoptoserate nach Kostimulation mit Rapamycin induziert wurde. Die Melanomzelllinien



haben möglicherweise eine Resistenz gegenüber Rapamycin entwickelt, welche die Verstärkung der Apoptose verhindern. Als eine der möglichen Ursachen der Rapamycin-Resistenz werden die Mutationen von mTOR betrachtet, weil es dadurch eine niedrige Bindungsaffinität für Rapamycin besitzt und es somit nicht zu dessen Inaktivierung kommt (Kurmasheva et al., 2006).

Seit Jahren wird über den Zusammenhang zwischen der Köderrezeptor-Expression und der TRAIL-Resistenz diskutiert (Degli-Esposti et al., 1997a, b; Merino et al., 2007). Es wurde angenommen, dass die Köderrezeptoren (TRAIL-R3, TRAIL-R4) mit den Todesrezeptoren (TRAIL-R1, TRAIL-R2) um die Bindung von TRAIL konkurrieren und Zellen so vor der TRAIL-induzierten Apoptose schützen können. Auch Merino et al. postulierten diese Annahme, dass der Köderrezeptor DcR2 (TRAIL-R4) die Rekrutierung von pro-apoptotischen Rezeptoren an den DISC durch die TRAIL Stimulation verhindert. Zusätzlich inhibiert der Köderrezeptor DcR1 (TRAIL-R3) den Aufbau des DISC durch Titration von TRAIL innerhalb von Membran-Mikrodomänen, sogenannten Lipid-rafts. Die Tatsache, dass sich die TRAIL Rekombinanten nach der Stimulation in den Lipid-rafts aufhalten und dass der Köderrezeptor DcR1 als einziger der TRAIL-R sich in Lipid-rafts vermehrt aufhält, begünstigt diese Titration (Merino et al., 2006). Dies scheint aber nicht die Regel zu sein, da andere Publikationen diese Behauptungen widerlegen. So konnte gezeigt werden, dass Zellen, die eine starke Köderrezeptor-Expression auf der Oberfläche aufweisen, trotzdem sensitiv auf die Behandlung mit TRAIL reagierten (Griffith et al., 1998b). Auch spezifische, gegen die unterschiedlichen TRAIL-Rezeptoren gerichtete Antikörper erbrachten nicht den erwarteten Zusammenhang zwischen der TRAIL-Resistenz und der Köderrezeptorexpression (Walczak & Krammer, 2000). Die Untersuchung der TRAIL-Rezeptor-Expression der 18 Melanomzelllinien brachte recht eindeutig zum Ausdruck, dass die TRAIL-Suszeptibilität nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, auf dem Expressionsmuster der TRAIL-Rezeptoren begründet liegt. Das Expressionsmuster zeigte grundsätzlich, dass nur sehr wenig Köderrezeptoren exprimiert werden. In wenigen Fällen existieren theoretische Übereinstimmungen mit der TRAIL-Suszeptibilität, aber die Anzahl der Gegenbeispiele, die keine Korrelation zwischen Köderrezeptorexpression und TRAIL-Suszeptibilität zulassen, überwiegen weitgehend. TRAIL-R1 kann sowohl durch lösliches (iz-TRAIL) als auch durch membrangebundenes TRAIL aktiviert werden, während TRAIL-R2 nur durch membrangebundenes TRAIL

aktiviert werden kann (Wajant et al., 2001). Hinweise auf eine dominierende Rolle bei der Vermittlung der Apoptose gibt es sowohl für TRAIL-R1 als auch für TRAIL-R2. So konnte eine erhöhte TRAIL Sensitivität mit einer hohen TRAIL-R1 Expression in Melanomzellen korreliert werden (Kurbanov et al., 2005). Andererseits konnte in humanen Myelomzellen die Apoptose über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 induziert werden, wobei die Effizienz über TRAIL-R2 stärker war, obwohl es sich um eine lösliche TRAIL Variante (Apo2L/TRAIL.0) handelte (Gómez-Benito et al., 2007). Auch dies scheint nicht immer die Regel zu sein, da die meisten hier untersuchten Zelllinien entweder TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder beides exprimierten, unabhängig von deren TRAIL-Suszeptibilität. Zudem konnte auch in TRAIL-resistenten Zelllinien, die beide antagonistischen Rezeptoren exprimierten, keine Apoptoseinduktion durch die Stimulation mit membrangebundenem TRAIL erreicht werden (Diplomarbeit von Alexandra Kunz). Somit ist das Expressionsmuster der agonistischen und antagonistischen TRAIL-Rezeptoren nicht entscheidend oder zumindest nicht allein ausschlaggebend für die TRAIL-Suszeptibilität in den hier untersuchten Melanomzelllinien.

Intrazelluläre Mechanismen spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der TRAIL-Resistenz. Über den Einfluss pro- und anti-apoptotischer Proteine auf die TRAIL-vermittelte Apoptose wird seit Jahren viel diskutiert. Zu den Proteinen bzw. Interaktionspartnern, die eine entscheidende Rolle in der TRAIL-Suszeptibilität spielen, zählen vor allem Caspase-8 und FLIP sowie Caspase-3 und XIAP (Griffith et al., 1998a; Chawla-Sarkar et al., 2004; Xiao et al., 2005). Eine ungleiche Expression dieser pro- und anti-apoptotischen Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung, da diese über das Überleben bzw. den Tod der Zellen entscheidet. Eine Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten der pro-apoptotischen Seite würde eine Sensitivierung bzw. Apoptose in den Tumorzellen induzieren (Graaf et al., 2004; Hastak et al., 2003). Vor allem die Überexpression der anti-apoptotischen Proteine, wie XIAP und FLIP begründen die TRAIL-vermittelte Resistenz und begünstigen somit die Melanomentwicklung (Chawla-Sarkar et al., 2004; Griffith et al., 1998a). Es konnte zusätzlich in primitiven neuroektodermalen Tumorzellen (PNET) gezeigt werden, dass nur die TRAIL-sensitiven PNET Zellen Caspase-8 exprimierten, wohingegen in TRAIL-resistenten Zellen keinerlei Caspase-8 Expression detektierbar war (Grotzer et al., 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in Neuroblastomzellen (NB) erzielt. Hier

exprimierten maligne NB-Zellen niedrige Caspase-8 Proteinmengen im Vergleich zum benignen Ganglioneurom (Hopkins-Donaldson et al., 2000).

Die Prozessierungsmuster der Caspase-8, sowie die Ergebnisse der Caspase-8-Aktivitätsanalysen stimmten weitgehend mit dem initialen Apoptoseverhalten gegenüber TRAIL-Stimulation überein. So zeigten TRAIL-resistente Zelllinien grundsätzlich keine Caspase-8-Prozessierung und -Aktivierung, während sensitive Zelllinien deutliche Caspase-8 Spaltung demonstrierten. TRAIL-Suszeptibilität scheint also tatsächlich auf der Basis des rezeptornahen DISC entschieden zu werden. Überraschenderweise zeigten 3 resistente Melanomzelllinien (WM-115 (R/s), WM-3248 (R/s), MV3 (R/s)) trotzdem Caspase-8 Prozessierung, die allerdings wiederum nicht mit einer katalytischen Aktivitätssteigerung einherging. Vermutlich wird die enzymatische Aktivität durch Bindung eines anti-apoptotischen Proteins an die prozessierte Caspase-8 verhindert, ähnlich wie es für die Interaktion von IAP Proteinen mit Effektorcaspasen beschrieben ist (Han et al., 1997; Micheau & Merino, 2004). FLIP kommt mit großer Wahrscheinlichkeit hier nicht in Frage, da es normalerweise bereits die Caspase-8 Prozessierung verhindert (Bullani et al., 2001). Die anti-apoptotischen Proteine cIAP („cellular IAP“) könnten hier möglicherweise in Frage kommen. Es wurde postuliert, dass cIAP Proteinen die Caspase-8 Aktivität nach TNF Stimulation unterdrücken (Wang et al., 1998), obwohl Eckelman et al. im Gegenteil zeigen konnten, dass die beiden cIAP Formen (cIAP1 und cIAP2) nur Caspase binden, ohne sie jedoch zu inaktivieren (Eckelman et al., 2006a). Somit steht dies im Widerspruch zu dem, was von Wang et al. gezeigt wurde und erfordert weitere Versuchsansätze in Melanomzellen. Alternativ postulierten Skaletskaya et al. dass im humanen Zytomegalie Virus ein Zelltod-Inhibitor namens vICA (viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis) identifiziert wurde, der die Aktivierung von Caspase-8 durch FAS verhindern kann. Es übernimmt somit eine ähnliche Aufgabe wie die FLIP Proteine, aber über den genauen Mechanismus ist wenig bekannt. vICA weist jedoch keine AS Sequenzhomologie zum zellulären oder viralen FLIP auf (Skaletskaya et al., 2001). Ob im Melanomsystem auch ein ähnlicher bzw. gleicher Apoptoseinhibitor wie vICA existiert, der vermutlich die finale Caspase-8 Prozessierung verhindern kann, bleibt bis dato ungeklärt.

Eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der TRAIL Resistenz spielt das FLIP Protein, welches in mindestens 2 Splicevarianten existiert: c-FLIP<sub>L</sub> (long) und c-FLIP<sub>S</sub> (short).

Dem c-FLIP<sub>L</sub> Protein wird außer den anti-apoptotischen mitunter auch pro-apoptotische Eigenschaften zugesprochen, wobei die Caspase-8 am DISC aktiviert und die Apoptose induziert wird (Chang et al., 2002). Aber bei Anwesenheit von FLIP<sub>S</sub> kann die Procaspase-8 überhaupt nicht gespalten und somit die Apoptose auch nicht induziert werden (Krueger et al., 2001a, b). Die meisten hier untersuchten Melanomzelllinien exprimierten nur FLIP<sub>L</sub>, nur wenige Zelllinien exprimierten FLIP<sub>S</sub>. Trotzdem scheint die FLIP Expression eine entscheidende Rolle im Melanomsystem zu spielen, denn Griffith et al. postulierten, dass TRAIL-resistente Melanomzellen viel mehr FLIP exprimieren als TRAIL-sensitive Zelllinien (Griffith et al., 1998a). Eigene Vorläuferstudien konnten ebenfalls eine Korrelation zwischen der TRAIL Resistenz und der FLIP<sub>S</sub> Expression in Melanomzelllinien herstellen und erreichten eine UVB-vermittelte Sensitivierung dieser Zelllinien durch Herunterregulierung des FLIP Proteins (Zeise et al., 2004). Andere konnten diese Aussage widerlegen, da in Melanomzellen (Zhang et al., 1999) und Ewing-Sarkom Zellen (Mitsiades et al., 2001) auch gezeigt werden konnte, dass die FLIP-Expression nicht mit der TRAIL-Resistenz korreliert. Eine entscheidende Rolle des Caspase-8 Antagonisten FLIP in der Vermittlung der TRAIL-Resistenz konnte in der hier durchgeführten Untersuchung weitgehend ausgeschlossen werden, da das Expressionsniveau von FLIP sowohl in resistenten als auch in sensitiven Zelllinien nach unterschiedlichen apoptotischen Stimulationen konstant blieb (Thayaparasingham et al., 2008). Ebenfalls zeigten die durch UVB-Strahlung stark synergistisch sensitivierten Zelllinien keine gesteigerte Caspase-8-Prozessierung, was sich auch in einem nicht oder kaum gesteigerten Aktivierungsstatus ausdrückte. Während die Caspase-8-Prozessierung also weitgehend für die initiale TRAIL-Suszeptibilität verantwortlich zu sein scheint, wird über die Sensitivierbarkeit durch UVB-Strahlung hingegen an anderer Stelle in der Zelle entschieden. Diese Vermutung bestätigte sich durch die eindeutige Korrelation des Apoptoseverhaltens, mit der XIAP-Degradierung und der Caspase-3-Prozessierung und -Aktivierung erzielt werden konnte. Da XIAP an Effektor-Caspasen wie Caspase-3 bindet und dadurch deren vollständige Prozessierung und Aktivierung inhibiert (Kashkar et al., 2003; Eckelman et al., 2006b), wird unter anderem dadurch die TRAIL-Resistenz in verschiedensten Krebszellen induziert (Deveraux et al., 1997; Danson et al., 2006; Micheau & Merino, 2004; Schimmer et al., 2006). So vermittelt eine Reduktion des XIAP-Niveaus durch RNA-Interferenz in Pankreaszellen (Vogler et al., 2006) bzw. eine Reduktion der XIAP-Aktivität durch Überexpression des pro-apoptotischen Proteins Smac/DIABLO in Melanomzellen (Zhang et al., 2001) eine

Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose. Im hier untersuchten Melanomsystem konnte zunächst festgestellt werden, dass alle 10 resistenten Zelllinien im Verhältnis mehr XIAP als Caspase-3 exprimierten. In 6 der 8 sensitiven Zelllinien wurden verhältnismäßig mehr Caspase-3 exprimiert als XIAP, was ihrem Apoptoseverhalten entsprach. Somit scheint das zelluläre Caspase-3/XIAP Verhältnis eine prominente Rolle für die TRAIL-Suszeptibilität der Melanomzellen zu spielen.

TRAIL allein induziert in resistenten Zelllinien keine bzw. nur eine partielle Prozessierung der Caspase-3 in das katalytisch inaktive 21 kD Fragment. Dies geht mit einem stabilen XIAP Proteinlevel einher. Die Sensitivierung dieser Zelllinien korrelierte immer mit einer vollständigen Prozessierung von Caspase-3 in das katalytisch aktive 17 kD Fragment und einer schwachen bis vollständigen XIAP-Depletion. Nur die Zelllinie WM-1552C folgte diesem Muster nicht, was aber den vorliegenden Mechanismus nur weiter bestärkt, da sie selbst durch Kostimulation mit UVB nicht sensibilisiert werden konnte. Der antagonistische Einfluss von XIAP auf die Caspase-3 spiegelt sich ebenfalls in der Caspase-3-Aktivität wieder, da in allen sensitivierbaren Zelllinien die UVB-induzierte vollständige Prozessierung nicht nur mit der XIAP-Depletion, sondern ebenfalls mit einem starken Anstieg der katalytischen Aktivität korrelierte .

Bei XIAP und FLIP handelt es sich jeweils um NF- $\kappa$ B regulierte Genprodukte (Wang et al., 2002; Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001). TRAIL kann eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B über die TRAIL Rezeptoren TRAIL-R1, TRAIL-R2 und eventuell TRAIL-R4 induzieren (Degli-Esposti et al., 1997b; Schneider et al., 1997; Ravi et al., 2001). NF- $\kappa$ B reguliert die Expression von über 150 Genen und trägt so zum Gleichgewicht zwischen Tod und Überleben bei (Ivanov et al., 2003; Richmond, 2002). Dieses Gleichgewicht wird durch die vermehrte Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie XIAP und FLIP, bedingt durch eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivierung während der Krebsentstehung, zerstört. Allerdings ist die Bedeutung der NF- $\kappa$ B Aktivierung für den TRAIL-induzierten Zelltod umstritten. Es existieren Berichte, dass die TRAIL-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung einen schützenden (Jeremias et al., 1998; Harper et al., 2001; Chawla-Sarkar et al., 2003) oder aber einen apoptotischen Effekt ausübt (Leverkus et al., 2003). Eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivierung wird in vielen Krebserkrankungen, darunter auch in Melanomzelllinien, aggressiveren Varianten des Adenokarzinoms und Tumoren lymphoiden und epithelialen Ursprungs beobachtet (Ueda & Richmond, 2006; Smirnov

et al., 2001; Wilson, 2008; Amiri et al., 2005). In Tumorzellen bedeutet dies eine Aufregulierung der anti-apoptotischen Gene, was vermutlich für die Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden/DNA-schädigenden Chemotherapeutika verantwortlich ist und somit einer erfolgreichen Tumorthherapie entgegensteht (Baldwin A.S., 2001). Ueda und Richmond postulierten eine Umwandlung der NF- $\kappa$ B Funktion von einem pro-apoptotischen in ein anti-apoptotisches Verhalten während der Progression vom primären Melanozyt zum Melanom. Die dadurch induzierte Erhöhung der anti-apoptotischen Proteine führte letztendlich zur Apoptoseresistenz (Ueda & Richmond, 2006). Desweiteren konnte in Melanomzellen die TRAIL-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung und die damit verbundene TRAIL-Resistenz durch einen Proteasomeninhibitor bzw. durch eine I $\kappa$ B $\alpha$  Superrepressorvariante rückgängig gemacht werden, so dass die Melanomzellen sensitiv gegenüber TRAIL wurden (Franco et al., 2001; Jeremias et al., 1998). Dies ist damit zu erklären, dass die TRAIL-induzierte und NF- $\kappa$ B-vermittelte XIAP Transkription der zytosolischen Depletion von XIAP entgegenwirkt und somit die Apoptoseresistenz vermittelt. Die XIAP-Eliminierung ist ein entscheidender Schritt für die Induktion der Todesrezeptor vermittelten Apoptose. Ein erhöhter XIAP Proteinstatus wird höchstwahrscheinlich durch dessen proteasomale Degradierung ausgeglichen die während der Apoptose stattfindet (Kashkar et al., 2007). Als zugrunde liegender Mechanismus wird einerseits die Autoubiquitinierung von XIAP postuliert. XIAP kann durch den Besitz einer RING-Domäne mit Ubiquitin-Ligase-Aktivität sich selbst und andere pro-apoptotische Proteine ubiquitinieren (Vaux & Silke, 2005). Entsprechend wurde in Hela Zellen durch proteasomale Inhibitoren die Rezeptor vermittelte Apoptose transient verhindert, weil ein schützender Effekt durch die XIAP-Stabilisierung erreicht wurde. Diese Daten kennzeichnen die äußerst wichtige Rolle des Proteasoms in der Apoptose und zeigen, dass die XIAP-Degradierung für eine schnelle Induktion der Apoptose notwendig ist (Sohn et al., 2006). Kugler postulierte, dass der intrazelluläre XIAP Gehalt mit der Malignität und Aggressivität von Tumoren steigt. Zusätzlich wurde eine XIAP-Degradierung durch Phenoxodiol, einem Chemotherapeutikum, nachgewiesen, was letztendlich zu einer Sensitivierung von Melanomzellen gegenüber dem Zytostatikum Carboplatin führte (Kluger et al., 2007). Andere Studien konnten zeigen, dass im Verlauf der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetztes, pro-apoptotisches Smac/DIABLO um die Caspase-3 Bindungsstelle von XIAP konkurriert, wodurch Caspase-3 von XIAP freigesetzt wird und so für die volle

Prozessierung und die Induktion von Apoptose zur Verfügung steht (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Srinivasula et al., 2001).

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass durch eine Kostimulation mit Interleukin-1 und UVB, NF- $\kappa$ B von einem Promotor in einen Repressor anti-apoptotischer Gene konvertiert, wodurch NF- $\kappa$ B pro-apoptotisch wirken kann (Pöppelmann et al., 2005, Strozyk et al., 2006, Barasic et al., 2008). Auch anderen Gruppen könnten die pro-apoptotische Rolle von NF- $\kappa$ B bestätigen, so kann NF- $\kappa$ B /RelA die Expression der Apoptose-induzierenden Gene wie Fas, Fas-Ligand und Todesrezeptoren stimulieren (Kucharczak et al., 2003). In anderen Fällen unterdrückt RelA die Expression von einigen anti-apoptotischen Genen als Antwort auf NF- $\kappa$ B Stimulatoren wie UVC und Daunorubicin (Zytostatikum) oder als Antwort auf die Einwirkung von Tumorsuppressoren (Liu et al., 2006; Campbell et al., 2004). In diesen Fällen scheint die Apoptose-sensitivierende NF- $\kappa$ B Aktivierung alternativ durch TNF, DNA Schaden oder p53 Aktivität moduliert zu werden (Campbell et al., 2006 a, b). Da UVB in einer Dosis appliziert wurde, die alleine nicht in der Lage ist Apoptose zu induzieren, dafür aber DNA Schädigungen induzieren kann, könnte der zugrunde liegende Mechanismus der TRAIL-Sensitivierung in der Veränderung der Eigenschaften des parallel aktivierten NF- $\kappa$ Bs begründet sein. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der semiquantitativen PCR voll bestätigt. Die Abnahme der XIAP Proteinmenge nach der TRAIL und UVB-Kostimulation ging eindeutig mit einer Repression der XIAP mRNA-Expression einher. Somit ist die sublethale UVB-Dosis indirekt an der Vermittlung pro-apoptotischer Prozesse und damit an der synergistischen Sensitivierung gegenüber der TRAIL induzierten Apoptose beteiligt. Eine Ausnahme stellt hier ebenfalls die bereits erwähnte, vollständig gegen TRAIL und die Kostimulation mit UVB resistente Melanomzelllinie WM-1552C dar. Entsprechend wurde in dieser Zelllinie weder eine I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung, noch eine XIAP-Depletion oder eine differenzielle NF- $\kappa$ B Regulierung beobachtet, und folgerichtig auch keine Caspase-Prozessierung. Der zugrunde liegende Mechanismus ist unbekannt, das Verhalten dieser Zelllinie bestätigt aber die Relevanz des aufgedeckten molekularen Mechanismus. Diese entscheidende Rolle für die NF- $\kappa$ B-induzierte, selektive Repression responsiver, anti-apoptotischer Gene konnte auch für FLIP, wenn auch in geringerer Intensität, bestätigt werden. Die Tatsache, dass sich die Repression der FLIP-Transkription nach 6 h nicht analog auf die Proteinebene übertragen ließ, könnte

damit zusammenhängen, dass FLIP Proteine eine längere Halbwertszeit als XIAP Proteine aufweisen. Entsprechend konnte eine vollständige FLIP Protein Depletion durch Transkriptionshemmung durch Actinomycin-D im Melanomsystem erst nach 24 h erreicht werden (Griffith et al., 1998a). Es ist also nicht auszuschließen, dass FLIP zu späteren Zeitpunkten an der Sensitivierung der TRAIL-resistenten Zellen durch UVB beteiligt ist. Dies scheint im Melanomsystem allerdings nicht der dominierende Faktor zu sein.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Depletion der NF- $\kappa$ B responsiven Proteine XIAP/FLIP tatsächlich durch differenzielle NF- $\kappa$ B Regulierung NF- $\kappa$ B vermittelt ist und nicht z.B. durch einen potentiellen UVB induzierten Zerfall der mRNA zustande kommt, konnte durch ein konstantes Expressionsniveau des nicht NF- $\kappa$ B responsiven Bax Gens erhalten werden. Im Gegenteil wird in der Literatur häufig sogar über eine Erhöhung der mRNA-Stabilität in Verbindung mit UV-Strahlung berichtet (Zhang et al., 2008a, b; Anzi et al., 2008), niemals aber mit einer Destabilisierung. Zudem scheint Bax keine große Rolle bei der TRAIL-Sensibilisierung zu spielen. Als Folge einer Apoptoseinduktion mit signifikanter Bax Beteiligung transloziert multimerisiertes Bax an die Mitochondrienmembran, um dort den intrinsischen Signalweg zu aktivieren. Als Folge kommt es zur Cytochrom C-Freisetzung und unter Ausbildung des Apoptosoms zur Aktivierung der Caspase-9 (Riedl & Guy S Salvesen, 2007; Cain et al., 2000; Liu et al., 1996). Der Caspase-9 Aktivitätsassay zeigte eine untergeordnete Rolle des intrinsischen Signalwegs, sowohl bei der TRAIL- als auch bei der TRAIL und UVB-induzierten Apoptose. Im Vergleich zu der signifikant hohen Caspase-3-Aktivität war die Caspase-9-Aktivität extrem niedrig. Somit wurde klargelegt, dass die Caspase-3-Aktivierung zwar durch die upstream Caspasen initiiert wird, für die Verstärkung der Apoptose durch UVB aber weder Caspase-8 noch Caspase-9 verantwortlich sind, sondern diese höchstwahrscheinlich durch die NF- $\kappa$ B gesteuerte Depletion von XIAP zustande kommt.

Der Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-abhängigen XIAP-Repression und Caspase-3 Prozessierung sowie deren Relevanz für die synergistische Induktion der Apoptose nach TRAIL und UVB Stimulation wurde in 4 TRAIL-resistenten Zelllinien (WM-3211 (RGP), WM-115 (VGP), MV3 (MM), BLM (HM)), die jedes Tumorprogressionsstadium repräsentieren, bestätigt. Durch ektopische Expression von XIAP konnte die TRAIL und



UVB-induzierte Apoptoserate zunächst signifikant reduziert werden. Desweiteren wurde ektopisch exprimiertes XIAP weniger stark depletiert als endogenes XIAP. Dies lässt sich damit erklären, dass sich nur das endogene XIAP unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B befindet und somit eine aktive, höchstwahrscheinlich NF- $\kappa$ B-abhängige Repression von XIAP als Folge der UVB-Kostimulation veranlasst wurde. Dagegen exprimierte der virale Promotor konstitutiv und NF- $\kappa$ B-unabhängig XIAP und hielt somit das XIAP-Level konstant. Entsprechend führte umgekehrt die Eliminierung von XIAP durch „*knock-down*“ zu einer signifikanten Sensibilisierung der resistenten Melanomzelllinien gegenüber alleiniger TRAIL Stimulation. XIAP scheint also tatsächlich eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der TRAIL-Resistenz aber auch bei der UVB-induzierten Sensitivierung zu spielen. Voraussetzung für die Sensitivierung durch die essentielle, verstärkte Depletion scheint die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkriptionsrepression von XIAP zu sein.

Diese molekularen Zusammenhänge wurden weiterhin durch die Expression eines I $\kappa$ B $\alpha$ -Superrepressors bestätigt, einer Variante, in welcher die zur Degradierung des Proteins essentiellen Ser-Reste an der Position 32/36, in Ala mutiert vorliegen und die somit die NF- $\kappa$ B Aktivierung verhindert. Da in I $\kappa$ B $\alpha$ -SR exprimierenden Zellen nicht nur die TRAIL und UVB-induzierte Apoptoserate reduziert werden konnte, sondern dies auch mit einer deutlich verringerten XIAP-Depletion einherging, konnte so die finale Verbindung zwischen der NF- $\kappa$ B induzierten XIAP-Depletion und der daraus resultierenden Caspase-3-Aktivierung und Apoptoseinduktion hergestellt werden.

Bei der Untersuchung des Depletionsmechanismus von XIAP traten an einem sehr frühen Punkt Unstimmigkeiten mit der herkömmlichen, in der Literatur vorherrschenden Meinung, einer rein proteasomalen Degradierung des Proteins auf (Yang et al., 2000; Huang et al., 2000; Li et al., 2002). Es ist bekannt das XIAP durch die RING-Domäne eine Ubiquitin Ligase Aktivität besitzt, wodurch es nach Apoptose-Induktion die Autoubiquitinierung und somit die proteasomale Degradierung von sich selbst aber auch von Caspasen und anderen pro-apoptotischen Proteinen einleiten kann (Yang & Li 2000; Suzuki et al., 2001a, b; Vaux & Silke, 2005). Andererseits wurde ebenfalls über eine Caspase-abhängige XIAP-Spaltung während der Apoptoseinduktion berichtet. So induzierte die FAS-Stimulation eine Spaltung von XIAP in zwei Fragmente durch eine nicht genau charakterisierte Caspase. Diese proteolytischen Fragmente besitzen

entweder die gleiche oder eine niedrigere Affinität zu Caspasen. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Strategie, die anti-apoptotische Wirkungsweise von XIAP auszuschalten (Deveraux et al., 1999b). So zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass der proteasomalen Degradierung von XIAP eine Caspase abhängige, proteolytische Spaltung vorausgeht. Es scheint also ein sehr enger wechselseitiger Caspase-XIAP „cross talk“ in Melanomzellen vorzuherrschen, der in Zukunft weiter aufgeschlüsselt werden muss. In diesem Zusammenhang liegt die Vermutung nahe, dass die prä-proteasomale Spaltung von XIAP durch Caspase-3 vermittelt wird. In der Literatur ist beschrieben, dass XIAP die aktivierte Caspase-3 ubiquitinieren und degradieren kann (Suzuki et al., 2001b). Hierbei handelt es sich aber um einen rein artifiziellen Versuchsaufbau, ohne jegliche *in vivo* Relevanz aufzuzeigen. Umgekehrt besitzt XIAP eine Caspase-Schnittstelle an Position 242, die durch verschiedene Caspasen gespalten werden kann (Deveraux, 1999b). Welche Caspase *in vivo* im Melanomsystem für die XIAP Spaltung verantwortlich ist und welche Relevanz diese Caspase vermittelte Spaltung für die Induktion der Apoptose hat, müssen zukünftige Experimente weiter beleuchten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die TRAIL-Resistenz nicht mit den Tumorprogressionsstadien korreliert. XIAP zählt zu den wichtigsten Proteinen, die die TRAIL-Resistenz vermitteln. Durch Kostimulation mit sublethalen UVB-Dosen wird eine stark synergistische TRAIL-Sensibilisierung erreicht, wobei eine pro-apoptotische Rolle von NF- $\kappa$ B als Inhibitor der XIAP-Transkription entschlüsselt wurde. Die resultierende zytosolische XIAP-Depletion, die mit einer sequentiellen Fragmentierung der Procaspase-3 einher geht, liefert einen weiteren Beweis dafür, dass die Regulation der TRAIL-Resistenz eher auf diesem Niveau erfolgt und nicht auf dem Level der Initiatorcaspase-8 im Bereich der DISC Bildung determiniert wird (Thayaparasingham et al., 2008).

## VI. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Aufbau der Haut .....	7
<b>Abbildung 1.2:</b> Übersicht über die Melanom-Progressionsstadien .....	9
<b>Abbildung 1.3:</b> Morphologische Veränderungen während der Apoptose .....	10
<b>Abbildung 1.4:</b> Caspase-Prozessierung .....	11
<b>Abbildung 1.5.1:</b> TNF-Rezeptor Aktivierung .....	12
<b>Abbildung 1.5.2:</b> TRAIL-Rezeptor-Familie .....	13
<b>Abbildung 1.5.3:</b> TRAIL vermittelte Apoptose .....	14
<b>Abbildung 1.6:</b> Sequenzhomologie von FLIP zur Caspase-8 .....	15
<b>Abbildung 1.7:</b> Das Apoptosom .....	17
<b>Abbildung 1.8:</b> Caspase-3-Prozessierung .....	18
<b>Abbildung 1.12:</b> NF- $\kappa$ B als Repressor der Apoptose .....	24
<b>Abbildung 4.1.1:</b> Melanozyten sind auch gegenüber starken apoptotischen Stimuli resistent .....	39
<b>Abbildung 4.1.2:</b> TRAIL-Dosiskinetik von Melanomzelllinien .....	41
<b>Abbildung 4.1.3 (1):</b> UVB-Kostimulation sensibilisiert TRAIL-resistente Melanomzelllinien .....	43
<b>Abbildung 4.1.3 (2):</b> Schematische Zusammenfassung .....	44
<b>Abbildung 4.1.4:</b> Sensitivierbarkeit der Melanomzelllinien gegenüber Fas-Stimulation .....	47
<b>Abbildung 4.1.5:</b> Die Kostimulation mit Rapamycin führt nicht zu einer Steigerung der Apoptoserate .....	49
<b>Abbildung 4.2.1:</b> TRAIL-resistente primäre Melanozyten exprimieren die agonistischen TRAIL-Rezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 .....	50
<b>Abbildung 4.2.2:</b> Das Expressionsmuster der agonistischen und antagonistischen TRAIL-Rezeptoren korreliert nicht eindeutig mit der TRAIL-Suszeptibilität .....	52
<b>Abbildung 4.3.1:</b> Expressionsprofil des apoptotischen Proteins Caspase-8 und der anti-apoptotischen Proteine FLIP <sub>L</sub> bzw. FLIP <sub>S</sub> .....	59
<b>Abbildung 4.3.2:</b> XIAP/Caspase-3-Expressionsmuster korreliert mit Apoptoseverhalten .....	61
<b>Abbildung 4.4.1:</b> FLIP <sub>L</sub> und Caspase-8 Prozessierungsstatus spielen nicht die entscheidende Rolle in der UVB-induzierten Sensitivierung .....	63
<b>Abbildung 4.5.1:</b> Die Caspase-3-Prozessierung korreliert mit der I $\kappa$ B $\alpha$ und der XIAP Degradierung .....	68
<b>Abbildung 4.6.1 (1):</b> Die Kostimulation mit UVB induziert die Repression des anti-apoptotischen Gens FLIP .....	74
<b>Abbildung 4.6.1 (2):</b> Die Kostimulation mit UVB induziert die Repression des anti-apoptotischen Gens XIAP .....	75
<b>Abbildung 4.7.1:</b> Die Kostimulation mit UVB führt nicht zur Repression des pro-apoptotischen Gens Bax .....	77
<b>Abbildung 4.7.2:</b> Die Aktivität der Caspase-9 ist so niedrig wie die von Caspase-8 .....	79
<b>Abbildung 4.8.1:</b> A) XIAP-Überexpression induziert Resistenz der Melanomzelllinien .....	82
B) Der „knock-down“ von XIAP erhöhte die apoptotische Antwort der Zellen auf die TRAIL-Stimulation .....	82

<b>Abbildung 4.8.2:</b> I $\kappa$ B $\alpha$ -SR-Überexpression induziert eine signifikante Senkung der Apoptoserate.....	85
<b>Abbildung 4.9.1:</b> Die XIAP-Degradierung ist kein rein proteasomaler Prozess .....	87
<b>Abbildung 4.9.2:</b> Caspase-Inhibierung (zQVD) verhindert die XIAP-Spaltung .....	87

## VII. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> Oligonukleotide/siRNA Sequenz .....	27
<b>Tabelle 2.2:</b> Plasmide .....	27
<b>Tabelle 2.3:</b> Primäre Antikörper.....	27
<b>Tabelle 2.4:</b> Sekundäre Antikörper .....	28
<b>Tabelle 2.5 :</b> Geräte .....	28
<b>Tabelle 2.6 :</b> Puffer und Lösungen .....	29
<b>Tabelle 3.1:</b> Verwendete Melanomzelllinien .....	32
<b>Tabelle 3.11.1:</b> Pipetierschema für die PCR .....	37
<b>Tabelle 3.11.2:</b> PCR-Bedingungen .....	37
<b>Tabelle 4.1.1:</b> Die TRAIL-Suszeptibilität der Melanomzelllinien ist unabhängig vom Tumorprogressionsstadium .....	45
<b>Tabelle 4.2.1 :</b> Zusammenfassung der delta Gmean-Werte der TRAIL-Rezeptorexpression.....	56

---

## VIII. Literaturverzeichnis

1. **Amiri, K. I. and Richmond, A.** (2005). Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 301-13.
2. **Anzi, S., Finkin, S. and Shaulian, E.** (2008). Transcriptional repression of c-Jun's E3 ubiquitin ligases contributes to c-Jun induction by UV. *Cell Signal* **20**, 862-71.
3. **Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A. and Schwarz, T.** (1998). Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **140**, 171-82.
4. **Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-8.
5. **Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A. et al.** (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **104**, 155-62.
6. **Baeuerle, P. A. and Baltimore, D.** (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**, 540-6.
7. **Bakker, T. R., Reed, D., Renno, T. and Jongeneel, C. V.** (1999). Efficient adenoviral transfer of NF-kappaB inhibitor sensitizes melanoma to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Int J Cancer* **80**, 320-3.
8. **Baldwin, A. S.** (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**, 241-6.
9. **Baldwin, A. S., Jr.** (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-83.
10. **Barisic, S., Strozyk, E., Peters, N., Walczak, H. and Kulms, D.** (2008). Identification of PP2A as a crucial regulator of the NF-kappaB feedback loop: its inhibition by UVB turns NF-kappaB into a pro-apoptotic factor. *Cell Death Differ* **15**, 1681-90.
11. **Beg, A. A. and Baltimore, D.** (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* **274**, 782-4.
12. **Beissert, S. and Schwarz, T.** (1999). Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Investig Dermatol Symp Proc* **4**, 61-4.
13. **Belizario, J. E., Alves, J., Occhiucci, J. M., Garay-Malpartida, M. and Sesso, A.** (2007). A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res* **40**, 1011-24.
14. **Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. and Wallach, D.** (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-15.

15. **Bongarzone, E. R., Pasquini, J. M. and Soto, E. F.** (1995). Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. *J Neurosci Res* **41**, 213-21.
16. **Brown, E. J., Beal, P. A., Keith, C. T., Chen, J., Shin, T. B. and Schreiber, S. L.** (1995). Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* **377**, 441-6.
17. **Bullani, R. R., Huard, B., Viard-Leveugle, I., Byers, H. R., Irmeler, M., Saurat, J. H., Tschopp, J. and French, L. E.** (2001). Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* **117**, 360-4.
18. **Bullani, R. R., Wehrli, P., Viard-Leveugle, I., Rimoldi, D., Cerottini, J. C., Saurat, J. H., Tschopp, J. and French, L. E.** (2002). Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res* **12**, 263-70.
19. **Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M. and Cohen, G. M.** (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**, 6067-70.
20. **Campbell, K. J. and Perkins, N. D.** (2006a). Regulation of NF-kappaB function. *Biochem Soc Symp*, 165-80.
21. **Campbell, K. J., Witty, J. M., Rocha, S. and Perkins, N. D.** (2006b). Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor-kappaB transactivation. *Cancer Res* **66**, 929-35.
22. **Campbell, K. J., Chapman, N. R. and Perkins, N. D.** (2001). UV stimulation induces nuclear factor kappaB (NF-kappaB) DNA-binding activity but not transcriptional activation. *Biochem Soc Trans* **29**, 688-91.
23. **Campbell, K. J., Rocha, S. and Perkins, N. D.** (2004). Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell* **13**, 853-65.
24. **Carter, B. Z., Gronda, M., Wang, Z., Welsh, K., Pinilla, C., Andreeff, M., Schober, W. D., Nefzi, A., Pond, G. R., Mawji, I. A. et al.** (2005). Small-molecule XIAP inhibitors derepress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* **105**, 4043-50.
25. **Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E. and Yang, X.** (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* **21**, 3704-14.
26. **Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S., Lindner, D. J. and Borden, E. C.** (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**, 915-23.
27. **Chawla-Sarkar, M., Bauer, J. A., Lupica, J. A., Morrison, B. H., Tang, Z., Oates, R. K., Almasan, A., DiDonato, J. A., Borden, E. C. and Lindner, D. J.** (2003). Suppression of NF-kappa B survival signaling by nitrosylcobalamin sensitizes neoplasms to the anti-tumor effects of Apo2L/TRAIL. *J Biol Chem* **278**, 39461-9.

28. **Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
29. **Clark, W. H., Jr.** (1991). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev* **10**, 83-8.
30. **Cohen, G. M.** (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** ( Pt 1), 1-16.
31. **Cohen, J. J.** (1991). Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* **50**, 55-85.
32. **Danson, S., Dean, E., Dive, C. and Ranson, M.** (2007). IAPs as a target for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **7**, 785-94.
33. **De Graaf, A. O., de Witte, T. and Jansen, J. H.** (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer? *Leukemia* **18**, 1751-9.
34. **De Kok, T. M., ten Vaarwerk, F., Zwingman, I., van Maanen, J. M. and Kleinjans, J. C.** (1994). Peroxidation of linoleic, arachidonic and oleic acid in relation to the induction of oxidative DNA damage and cytogenetic effects. *Carcinogenesis* **15**, 1399-404.
35. **Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G. and Smith, C. A.** (1997a). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* **186**, 1165-70
36. **Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A. and Goodwin, R. G.** (1997b). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7**, 813-20.
37. **Dejosez, M., Ramp, U., Mahotka, C., Krieg, A., Walczak, H., Gabbert, H. E. and Gerharz, C. D.** (2000). Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ* **7**, 1127-36.
38. **Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W. and Vandenabeele, P.** (2001). Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* **58**, 356-70.
39. **Deveraux, Q. L. and Reed, J. C.** (1999a). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-52.
40. **Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1999b). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* **18**, 5242-51.
41. **Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-4.
42. **Di Pietro, R. and Zauli, G.** (2004). Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* **201**, 331-40.
43. **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.

44. **Dubrez, L., Coll, J. L., Hurbin, A., Solary, E. and Favrot, M. C.** (2001). Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. *J Biol Chem* **276**, 38980-7.
45. **Eckelman, B. P. and Salvesen, G. S.** (2006a). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem* **281**, 3254-60.
46. **Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. and Scott, F. L.** (2006b). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**, 988-94.
47. **Elder, D. E., Clark, W. H., Jr., Elenitsas, R., Guerry, D. t. and Halpern, A. C.** (1993). The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin Diagn Pathol* **10**, 18-35
48. **Emanuel, P. O., Phelps, R. G., Mudgil, A., Shafir, M. and Burstein, D. E.** (2008). Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma. *J Cutan Pathol* **35**, 292-7.
49. **Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P.** (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **18**, 7719-30.
50. **Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. and Blenis, J.** (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* **16**, 1472-87.
51. **Franco, A. V., Zhang, X. D., Van Berkel, E., Sanders, J. E., Zhang, X. Y., Thomas, W. D., Nguyen, T. and Hersey, P.** (2001). The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* **166**, 5337-45.
52. **Ganten, T. M., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Buchler, P., Haas, T. L., Schader, M. B., Untergasser, A., Stremmel, W. and Walczak, H.** (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res* **12**, 2640-6.
53. **Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T. L., Diessenbacher, P., Sprick, M. R., Schon, M. P., Henkler, F., Gollnick, H., Walczak, H. et al.** (2007). Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene*. **27**, 3211-20.
54. **Gomez-Benito, M., Martinez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Marzo, I. and Naval, J.** (2007). Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Exp Cell Res* **313**, 2378-88.
55. **Green, D. R. and Reed, J. C.** (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.
56. **Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H. and Kubin, M. Z.** (1998a). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* **161**, 2833-40
57. **Griffith, T. S. and Lynch, D. H.** (1998b). TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* **10**, 559-63



58. Grossman, D., Kim, P. J., Blanc-Brude, O. P., Brash, D. E., Tognin, S., Marchisio, P. C. and Altieri, D. C. (2001). Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* **108**, 991-9.
59. Grotzer, M. A., Eggert, A., Zuzak, T. J., Janss, A. J., Marwaha, S., Wiewrodt, B. R., Ikegaki, N., Brodeur, G. M. and Phillips, P. C. (2000). Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* **19**, 4604-10.
60. Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M. et al. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* **8**, 128-35.
61. Han, Z., Hendrickson, E. A., Bremner, T. A. and Wyche, J. H. (1997). A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem* **272**, 13432-6.
62. Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M. and MacFarlane, M. (2001). Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* **276**, 34743-52.
63. Hastak, K., Gupta, S., Ahmad, N., Agarwal, M. K., Agarwal, M. L. and Mukhtar, H. (2003). Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* **22**, 4851-9.
64. Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6.
65. Henry, H., Thomas, A., Shen, Y. and White, E. (2002). Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene* **21**, 48-60.
66. Holcik, M. and Korneluk, R. G. (2001). XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 550-6.
67. Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J. L., Bours, K. B., Brognara, C. B., Tschopp, J. and Gross, N. (2000). Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* **60**, 4315-9.
68. Hsu, M. Y., Meier, F. and Herlyn, M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**, 522-36.
69. Hu, S. and Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* **278**, 10055-60.
70. Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. and Dixit, V. M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17255-7.
71. Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Leverson, J. D. and Hunter, T. (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* **275**, 26661-4.

72. Huang, T. T., Feinberg, S. L., Suryanarayanan, S. and Miyamoto, S. (2002). The zinc finger domain of NEMO is selectively required for NF-kappa B activation by UV radiation and topoisomerase inhibitors. *Mol Cell Biol* **22**, 5813-25.
73. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C. et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5.
74. Ivanov, V. N., Bhoumik, A. and Ronai, Z. (2003). Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* **22**, 3152-61.
75. Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-54.
76. Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B. and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* **16**, 3693-704.
77. Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T. and Debatin, K. M. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* **91**, 4624-31.
78. Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hofmann, T. G., Hehner, S. P., Droge, W. and Schmitz, M. L. (2000). The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* **267**, 3828-35.
79. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63.
80. Karin, M. and Delhase, M. (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* **12**, 85-98.
81. Kashkar, H., Deggerich, A., Seeger, J. M., Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Haubert, D., Pongratz, C. and Kronke, M. (2007). NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood* **109**, 3982-8.
82. Kashkar, H., Haefs, C., Shin, H., Hamilton-Dutoit, S. J., Salvesen, G. S., Kronke, M. and Jurgensmeier, J. M. (2003). XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* **198**, 341-7.
83. Kerr, J. F., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-26.
84. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
85. Kim, M. R., Lee, J. Y., Park, M. T., Chun, Y. J., Jang, Y. J., Kang, C. M., Kim, H. S., Cho, C. K., Lee, Y. S., Jeong, H. Y. et al. (2001). Ionizing radiation can overcome resistance to TRAIL in TRAIL-resistant cancer cells. *FEBS Lett* **505**, 179-84.
86. Kim, S. C., Park, S. S. and Lee, Y. J. (2008). Effect of UV irradiation on colorectal cancer cells with acquired TRAIL resistance. *J Cell Biochem* **104**, 1172-80.
87. Kirchhoff, S., Muller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I. and Krammer, P. H. (2000). TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-

- mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* **165**, 6293-300.
88. **Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E.** (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**, 5579-88.
89. **Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J. and Ashkenazi, A.** (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**, 611-20.
90. **Kluger, H. M., McCarthy, M. M., Alvero, A. B., Sznol, M., Ariyan, S., Camp, R. L., Rimm, D. L. and 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.
91. **Kothny-Wilkes, G., Kulms, D., Luger, T. A., Kubin, M. and Schwarz, T.** (1999). Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand- and CD95-induced apoptosis but not from ultraviolet radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 28916-21.
92. **Kothny-Wilkes, G., Kulms, D., Poppelmann, B., Luger, T. A., Kubin, M. and Schwarz, T.** (1998). Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* **273**, 29247-53.
93. **Kraemer, K. H.** (1997). Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11-4.
94. **Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. and Wajant, H.** (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* **21**, 3964-73.
95. **Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S.** (2001a). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**, 20633-40.
96. **Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S.** (2001b). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **21**, 8247-54.
97. **Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y. and Gelinas, C.** (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**, 8961-82.
98. **Kulms, D. and Schwarz, T.** (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **16**, 195-201.
99. **Kulms, D., Dussmann, H., Poppelmann, B., Stander, S., Schwarz, A. and Schwarz, T.** (2002). Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death Differ* **9**, 598-608.
100. **Kulms, D., Poppelmann, B., Yarosh, D., Luger, T. A., Krutmann, J. and Schwarz, T.** (1999). Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7974-9.

101. **Kurbanov, B. M., Geilen, C. C., Fecker, L. F., Orfanos, C. E. and Eberle, J.** (2005). Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Invest Dermatol* **125**, 1010-9.
102. **Kurmasheva, R. T., Huang, S. and Houghton, P. J.** (2006). Predicted mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Br J Cancer* **95**, 955-60.
103. **LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. and MacKenzie, A. E.** (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-59.
104. **Lacour, S., Hammann, A., Wotawa, A., Corcos, L., Solary, E. and Dimanche-Boitrel, M. T.** (2001). Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res* **61**, 1645-51.
105. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
106. **Lasithiotakis, K. G., Sinnberg, T. W., Schittek, B., Flaherty, K. T., Kulms, D., Maczey, E., Garbe, C. and Meier, F. E.** (2008). Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells. *J Invest Dermatol* **128**, 2013-23.
107. **LeBlanc, H. N. and Ashkenazi, A.** (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10**, 66-75.
108. **Leong, K. G. and Karsan, A.** (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol* **15**, 1303-25.
109. **Leverkus, M., Sprick, M. R., Wachter, T., Denk, A., Brocker, E. B., Walczak, H. and Neumann, M.** (2003). TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. *J Invest Dermatol* **121**, 149-55.
110. **Leverkus, M., Sprick, M. R., Wachter, T., Mengling, T., Baumann, B., Serfling, E., Brocker, E. B., Goebeler, M., Neumann, M. and Walczak, H.** (2003). Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol* **23**, 777-90.
111. **Li X, Yang Y and Ashwell JD.** TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 2002: **416**, 345-49.
112. **Li X. and Stark, G. R.** (2002). NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* **30**, 285-96.
113. **Li, J., Feng, Q., Kim, J. M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Vanderhyden, B., Faught, W., Fung, M. F., Senterman, M. et al.** (2001). Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* **142**, 370-80.
114. **Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89.

115. **Li, Q. and Verma, I. M.** (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725-34.
116. **Liang, Y. G., Jorgensen, A. G., Kaestel, C. G., Wiencke, A. K., Lui, G. M., la Cour, M. H., Ropke, C. H. and Nissen, M. H.** (2000). Bcl-2, Bax, and c-Fos expression correlates to RPE cell apoptosis induced by UV-light and daunorubicin. *Curr Eye Res* **20**, 25-34.
117. **Lindahl, T.** (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-15.
118. **Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W. and Korneluk, R. G.** (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**, 128-33.
119. **Liu, J., Yang, D., Minemoto, Y., Leitges, M., Rosner, M. R. and Lin, A.** (2006). NF-kappaB is required for UV-induced JNK activation via induction of PKCdelta. *Mol Cell* **21**, 467-80.
120. **Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-57.
121. **Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J.** (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
122. **Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.** (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90.
123. **Ma, L., Huang, Y., Song, Z., Feng, S., Tian, X., Du, W., Qiu, X., Heese, K. and Wu, M.** (2006). Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Differ* **13**, 2079-88.
124. **MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M. and Alnemri, E. S.** (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **272**, 25417-20
125. **MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S. B. and Cohen, G. M.** (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* **277**, 36611-6.
126. **Maniatis, T.** (1997). Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex. *Science* **278**, 818-9.
127. **Maniatis, T.** (1999). A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev* **13**, 505-10.
128. **Mariani, S. M. and Krammer, P. H.** (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* **28**, 973-82.
129. **Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P. et al.** (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* **7**, 1003-6.

130. **Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H. N.** (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 298-308.
131. **McDade, T. P., Perugini, R. A., Vitimberga, F. J., Jr. and Callery, M. P.** (1999). Ubiquitin-proteasome inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Surgery* **126**, 371-7.
132. **Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Schitteck, B., Garbe, C. and Herlyn, M.** (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci* **3**, D1005-10.
133. **Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E. and Micheau, O.** (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* **26**, 7046-55.
134. **Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Solary, E. and Micheau, O.** (2007). TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin Ther Targets* **11**, 1299-314.
135. **Micheau, O. and Merino, D.** (2004). Controlling TRAIL-mediated caspase-3 activation. *Leukemia* **18**, 1578-80.
136. **Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. and Tschopp, J.** (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* **21**, 5299-305.
137. **Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C. and Grutter, M. G.** (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **277**, 45162-71.
138. **Mitsiades, N., Poulaki, V., Mitsiades, C. and Tsokos, M.** (2001). Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res* **61**, 2704-12.
139. **Moan, J., Porojnicu, A. C., Dahlback, A. and Setlow, R. B.** (2008). Addressing the health benefits and risks, involving vitamin D or skin cancer, of increased sun exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 668-73.
140. **Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K. and Yasuda, H.** (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem* **137**, 125-32.
141. **Muhlenbeck, F., Schneider, P., Bodmer, J. L., Schwenzer, R., Hauser, A., Schubert, G., Scheurich, P., Moosmayer, D., Tschopp, J. and Wajant, H.** (2000). The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J Biol Chem* **275**, 32208-13.
142. **Nagata, S.** (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-65.
143. **Nakajima, S., Lan, L., Kanno, S., Takao, M., Yamamoto, K., Eker, A. P. and Yasui, A.** (2004). UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. *J Biol Chem* **279**, 46674-7.
144. **Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. et al.** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43.

145. **Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. and Inohara, N.** (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**, 3237-45.
146. **Pahl, H. L.** (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-66.
147. **Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. and Dixit, V. M.** (1996). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**, 111-3.
148. **Panner, A., James, C. D., Berger, M. S. and Pieper, R. O.** (2005). mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Mol Cell Biol* **25**, 8809-23.
149. **Patrick, M. H.** (1977). Studies on thymine-derived UV photoproducts in DNA--I. Formation and biological role of pyrimidine adducts in DNA. *Photochem Photobiol* **25**, 357-72.
150. **Peter, M. E. and Krammer, P. H.** (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* **10**, 545-51.
151. **Peter, M. E. and Krammer, P. H.** (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**, 26-35.
152. **Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. and Ashkenazi, A.** (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271**, 12687-90.
153. **Pöppelmann, B., Klimmek, K., Strozyk, E., Voss, R., Schwarz, T. and Kulms, D.** (2005). NF{kappa}B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 15635-43.
154. **Pourzand, C. and Tyrrell, R. M.** (1999). Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* **70**, 380-90.
155. **Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinis, C., Fuchs, E. J. and Bedi, A.** (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* **3**, 409-16.
156. **Ricci, M. S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D. T. and El-Deiry, W. S.** (2004). Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* **24**, 8541-55.
157. **Richmond, A.** (2002). Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* **2**, 664-74.
158. **Riedl, S. J. and Salvesen, G. S.** (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 405-13.
159. **Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C. and Salvesen, G. S.** (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**, 791-800.

160. Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**, 6914-25.
161. Safa, A. R., Day, T. W. and Wu, C. H. (2008). Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 37-46.
162. Sahin, F., Kannangai, R., Adegbola, O., Wang, J., Su, G. and Torbenson, M. (2004). mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* **10**, 8421-5.
163. Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R. and Alnemri, E. S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **274**, 17941-5.
164. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**, 1675-87.
165. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 1541-8.
166. Schimmer, A. D., Dalili, S., Batey, R. A. and Riedl, S. J. (2006). Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* **13**, 179-88.
167. Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N. and Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* **7**, 831-6.
168. Scott, F. L., Denault, J. B., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M. and Salvesen, G. S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *Embo J* **24**, 645-55.
169. Sharp, D. A., Lawrence, D. A. and Ashkenazi, A. (2005). Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 19401-9.
170. Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I. et al. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-21
171. Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P. G., Day, C. L., Pakusch, M., Huang, D. C. and Vaux, D. L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16182-7.
172. Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. and Goldmacher, V. S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7829-34.
173. Smirnov, A. S., Ruzov, A. S., Budanov, A. V., Prokhortchouk, A. V., Ivanov, A. V. and Prokhortchouk, E. B. (2001). High constitutive level of NF-kappaB is crucial for viability of adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ* **8**, 621-30
174. Soengas, M. S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A. et al. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**, 207-11.



175. **Sohn, D., Totzke, G., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Levkau, B. and Janicke, R. U.** (2006). The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**, 1967-78.
176. **Sovak, M. A., Bellas, R. E., Kim, D. W., Zanieski, G. J., Rogers, A. E., Traish, A. M. and Sonenshein, G. E.** (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* **100**, 2952-60.
177. **Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H. and Walczak, H.** (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**, 599-609.
178. **Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et al.** (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-6.
179. **Stallone, G., Schena, A., Infante, B., Di Paolo, S., Loverre, A., Maggio, G., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F. P. and Grandaliano, G.** (2005). Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* **352**, 1317-23.
180. **Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S.** (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 299-306.
181. **Stephan, S., Datta, K., Wang, E., Li, J., Brekken, R. A., Parangi, S., Thorpe, P. E. and Mukhopadhyay, D.** (2004). Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 6993-7000.
182. **Strozyk, E., Poppelmann, B., Schwarz, T. and Kulms, D.** (2006). Differential effects of NF-kappaB on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome. *Oncogene* **25**, 6239-51.
183. **Sumitomo, M., Tachibana, M., Ozu, C., Asakura, H., Murai, M., Hayakawa, M., Nakamura, H., Takayanagi, A. and Shimizu, N.** (1999). Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression. *Hum Gene Ther* **10**, 37-47.
184. **Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C. and Takahashi, R.** (2001a). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* **276**, 27058-63.
185. **Suzuki, Y., Nakabayashi, Y. and Takahashi, R.** (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8662-7.
186. **Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* **273**, 7787-90.
187. **Thayaparasingham, B., Kunz, A., Peters, N. and Kulms, D.** (2008). Sensitization of melanoma cells to TRAIL by UVB-induced and NF-kappaB-mediated downregulation of XIAP. *Oncogene*.

188. Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meink, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M. et al. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-21.
189. Tirro, E., Consoli, M. L., Massimino, M., Manzella, L., Frasca, F., Sciacca, L., Vicari, L., Stassi, G., Messina, L., Messina, A. et al. (2006). Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res* **66**, 4263-72.
190. Tschopp, J., Irmeler, M. and Thome, M. (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**, 552-8.
191. Ueda, Y. and Richmond, A. (2006). NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res* **19**, 112-24.
192. Vaux, D. L. and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-97.
193. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
194. Vogler, M., Durr, K., Jovanovic, M., Debatin, K. M. and Fulda, S. (2007). Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene* **26**, 248-57.
195. Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* **10**, 1359-66.
196. Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P. and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* **20**, 4101-6.
197. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. TRAIL-R2: A novel apoptosismediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 1997; **16**: 5386-97.
198. Walczak, H. and Krammer, P. H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66.
199. Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T. et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* **5**, 157-63.
200. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-3.
201. Wang, Y., Chan, S. and Tsang, B. K. (2002). Involvement of inhibitory nuclear factor-kappaB (NFkappaB)-independent NFkappaB activation in the gonadotropic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis expression during ovarian follicular development in vitro. *Endocrinology* **143**, 2732-40.

202. **Wesselborg, S., Engels, I. H., Rossmann, E., Los, M. and Schulze-Osthoff, K.** (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* **93**, 3053-63.
203. **Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. et al.** (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**, 673-82.
204. **Wilson, W., 3rd and Baldwin, A. S.** (2008). Maintenance of constitutive I $\kappa$ B kinase activity by glycogen synthase kinase-3 $\alpha$ /beta in pancreatic cancer. *Cancer Res* **68**, 8156-63.
205. **Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N.** (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-84.
206. **Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R.** (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.
207. **Xiao, C., Yang, B. F., Song, J. H., Schulman, H., Li, L. and Hao, C.** (2005). Inhibition of CaMKII-mediated c-FLIP expression sensitizes malignant melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **304**, 244-55.
208. **Yang, L., Cao, Z., Yan, H. and Wood, W. C.** (2003). Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res* **63**, 6815-24.
209. **Yang, Y. L. and Li, X. M.** (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* **10**, 169-77.
210. **Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. and Ashwell, J. D.** (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-7.
211. **Young, A. R.** (1987). The sunburn cell. *Photodermatol* **4**, 127-34.
212. **Zeise, E., Weichenthal, M., Schwarz, T. and Kulms, D.** (2004). Resistance of human melanoma cells against the death ligand TRAIL is reversed by ultraviolet-B radiation via downregulation of FLIP. *J Invest Dermatol* **123**, 746-54.
213. **Zhang, J., Tsapralis, G. and Bowden, G. T.** (2008a). Nucleolin stabilizes Bcl-X L messenger RNA in response to UVA irradiation. *Cancer Res* **68**, 1046-54.
214. **Zhang, J. and Bowden, G. T.** (2008b). UVB irradiation regulates Cox-2 mRNA stability through AMPK and HuR in human keratinocytes. *Mol Carcinog* **47**, 974-83.
215. **Zhang, L. and Fang, B.** (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* **12**, 228-37.
216. **Zhang, X. D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T. and Hersey, P.** (1999). Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* **59**, 2747-53.

217. **Zhang, X. D., Zhang, X. Y., Gray, C. P., Nguyen, T. and Hersey, P.** (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res* **61**, 7339-48.
218. **Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X.** (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-13.

## IX. Bücher und andere Hilfsmittel

**Fritsch P.** Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas 2004.

**Ernst G. Jung** Dermatologie, von Hippokrates-Verlag 1995

**PFITZMANN, R. u. M. HUMMEL** (2001): Immunsuppressions- und Abstoßungstherapie. Organtransplantation. Transplantation thorakaler und abdomineller Organe. de Gruyter- Verlag, Berlin, New York, 23- 29

### Software

Image Quant Software (densitometrische Auswertung)

WIN/MDI 2.8 software (FACS)

EndNote (Literaturverzeichnis)

## X. Lebenslauf

Name: Thayaparasingham, Bharathy  
Geburtsdaten: 17.06.1975, Jaffna (Sri Lanka)  
Familienstand: ledig

### Promotion und Studium

---

5/2005 - 05/2009 **Promotion**  
Uni Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunologie

03/2005 **Hochschulabschluss:** Diplom-Biologin

04/2004 - 03/2005 **Diplomarbeit**  
Universität Hohenheim, Institut für Biologische Chemie und  
Ernährungswissenschaften

10/1999 - 03/2005 **Studium der Biologie**  
Universität Hohenheim, Stuttgart

### Ausbildung

---

10/1996 - 09/1999 Stattlich geprüfte medizinisch-technische  
Laboratoriumsassistentin (MTLA) am  
Katharinenhospital

### Schulbildung

---

08/1993 - 07/1996 Berufliches Gymnasium der 3-jährigen Aufbauform,  
Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Heilbronn

07/1991 - 07/1993 Berufsfachschule in Heilbronn (Realschule)

08/1988 - 06/1991 Hauptschule in Heilbronn (Klasse 7 - 9)

07/1985 - 05/1988 Gesamtschule in Indien (Klasse 4 - 6)

01/1982 - 01/1985 Grundschule in Sri Lanka (Klasse 1 - 3)