

Universität Stuttgart

Dissertation

**"Die Rolle von XIAP und Caspase-8
bei der Progression und Resistenz humaner Melanomen"**

**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
Manuela Hörnle
aus Biberach an der Riss**

**Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich
Mitberichter: PD Dr. Dagmar Kulms**

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2012

Institut für Zellbiologie und Immunologie
Universität Stuttgart

2012

Danksagung

Frau PD. Dr. Dagmar Kulms möchte ich für die einzigartige Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe diese Arbeit anzufertigen und Ihre Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit danken.

Vielen Dank an Prof. Dr. Peter Scheurich, der sich bereit erklärt hat, die Hauptberichterstattung zu übernehmen und diese Arbeit zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Nathalie Peters, die immer für Recht und Ordnung in unserem Labor gesorgt hat und uns alle mit einer unglaublichen Geduld ertragen hat. Unvergessen werden mir dein unglaubliches technisches Geschick und die vielen anregenden Diskussionen bleiben. Danke für deine Unterstützung Nats.

Ich möchte mich bei Hanna, Ines, Silvi, Andi und Fabi für die zahlreichen schönen und teilweise turbulenten Stunden im Labor bedanken. Langweilig war es mit euch nie.

Sandra, Anna, Simone, Thomas, Silvi und Ines danke ich für die hochintellektuellen und amüsanten Diskussionen in unserer Mittagsessensrunde. Danke für die vielen schönen und lustigen Erinnerungen.

Ich danke Andi, der mich vor dem Word-Formatierungs-Wahnsinn bewahrt hat.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie, die mich zu jeder Zeit in so vielerlei Hinsicht bedingungslos unterstützt und mir Rückhalt gegeben hat. Danke, dass ich immer auf euch bauen kann.

*Die Liebe zwischen zwei Menschen
lebt von den schönen Augenblicken,
aber sie wächst durch die schwierigen Zeiten,
die beide gemeinsam bewältigen.*

Rainer Haak

- für meine Mutter.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation:

**"Die Rolle von XIAP und Caspase-8
bei der Progression und Resistenz humaner Melanomen"**

ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

Vorabveröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Hörnle M., Peters N., Tharaparasingham B., Vörsmann H., Kaskar H., Kulms D. (2011) **Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis.** *Oncogene* 30: 575 – 578.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Widmung.....	II
Eidesstattliche Erklärung	III
Vorabveröffentlichungen.....	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung	- 1 -
Abstract	- 2 -
1 Einleitung	- 3 -
1.1 Die Haut.....	- 3 -
1.2 Entstehung von Hautkrebs	- 4 -
1.3 Das maligne Melanom.....	- 6 -
1.4 Apoptose - der programmierte Zelltod	- 7 -
1.5 Caspasen als Hauptmediatoren des programmierten Zelltodes.....	- 8 -
1.6 Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose: extrinsischer Signalweg.....	- 11 -
1.7 Die Mitochondrial-Vermittelte Apoptose: Der intrinsische Signalweg	- 13 -
1.8 Der Todesligand TRAIL als Tumorthapeutikum.....	- 14 -
1.9 Regulation des apoptotischen Zelltods.....	- 15 -
1.9.1 <i>Inhibitors of apoptosis proteins</i> – IAP's	- 15 -
1.9.2 Smac/Diablo	- 18 -
1.10 Apoptose-unabhängige Funktionen von Caspase-8.....	- 18 -
2 Material und Methoden.....	- 21 -
2.1 Material.....	- 21 -
2.1.1 Zelllinien	- 21 -
2.1.2 Antikörper	- 21 -
2.1.3 Enzyme.....	- 22 -
2.1.4 Größenmarker für die Protein- und DNA-Elektrophorese	- 22 -

2.1.5 Geräte und Materialien	- 23 -
2.1.6 Kits.....	- 26 -
2.1.7 Lösungen und Chemikalien	- 26 -
2.1.8 Medien.....	- 28 -
2.1.9 Inhibitoren, Stimulantien, Substrate.....	- 28 -
2.1.10 Plasmide	- 29 -
2.1.11 Primer	- 30 -
2.1.12 <i>small interfering</i> RNA (siRNA).....	- 31 -
2.1.13 Programme	- 31 -
2.1.14 Puffer (allgemein).....	- 32 -
2.1.15 Kometente Zellen (nach TFB-Methode).....	- 33 -
2.2 Methoden.....	- 34 -
2.2.1 Kultivierung primärer Melanozyten und Melanomzelllinien	- 34 -
2.2.2 Zellaussaat	- 35 -
2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	- 36 -
2.2.4 Vitalbestimmung mittels Trypanblau-Färbung	- 36 -
2.2.5 Stimulation der Zellen.....	- 36 -
2.2.6 <i>Cell Death Detection ELISA</i>	- 37 -
2.2.7 Caspase-Aktivitäts-Assay.....	- 37 -
2.2.8 Co-Immunopräzipitation.....	- 38 -
2.2.9 Mitochondrien-Zytosol Fraktionierung.....	- 39 -
2.2.10 Zytoplasma-Nukleus-Fraktionierung	- 39 -
2.2.11 Proteinbestimmung nach Bradford.....	- 39 -
2.2.12 Herstellung und Aufbereitung von Proteinextrakten.....	- 40 -
2.2.13 SDS-PAGE	- 40 -
2.2.14 Proteintransfer durch die Semi-dry Western-Blot-Methode.....	- 40 -
2.2.15 Immundetektion	- 41 -
2.2.16 Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti.....	- 41 -
2.2.17 Doppel-Thymidinblock / S-Phase-Arrest	- 42 -
2.2.18 Antikörperfärbung für Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	- 43 -
2.2.19 RNA-Isolierung.....	- 44 -
2.2.20 cDNA-Synthese.....	- 45 -

2.2.21	Klonierung.....	- 45 -
2.2.22	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	- 47 -
2.2.23	Mutagenese	- 47 -
2.2.24	Restriktionsverdau und Ligation in Expressionsvektoren	- 48 -
2.2.25	Herstellung Calcium-kompetenter Bakterien nach TFB-Methode	- 48 -
2.2.26	Transformation in Bakterien	- 48 -
2.2.27	Plasmid-Minipräparation	- 49 -
2.2.28	Elektroporation.....	- 49 -
2.2.29	<i>Lipofectamine</i> ²⁰⁰⁰ -Transfektion.....	- 50 -
3	Ergebnisse	- 52 -
3.1	Caspase-3 spaltet XIAP in einem regulatorischen <i>feedback-loop</i> zur synergistischen Induktion der Apoptose	- 52 -
3.1.1	Die Sensitivierung TRAIL-Resistenter Melanomzellen durch Bestrahlung mit sublethalen UVB-Dosen	- 52 -
3.1.2	Die XIAP-Trunkierung ist eine Caspase-abhängiger Prozess	- 54 -
3.1.3	XIAP wird durch Caspase-3 gespalten	- 58 -
3.1.4	Die synergistische Induktion von Apoptose erfordert mitochondriale Dysfunktion.....	- 59 -
3.1.5	Smac/Diablo erleichtert die synergistische Induktion von Apoptose.....	- 61 -
3.1.6	Cisplatin sensitiviert Melanomzellen ebenfalls für die TRAIL-induzierte Apoptose	- 63 -
3.2	Weitere Funktion von Caspase-8	- 66 -
3.2.1	Eine Caspase-8-Defizienz verändert das Zellzyklusprofil und resultiert in einer erhöhten Apoptoserate	- 66 -
3.2.2	Caspase-8-defiziente Melanomzellen arretieren in der S-Phase des Zellzyklus	- 67 -
3.2.3	Caspase-8 akkumuliert in Nuklei arretierter Melanomzellen.....	- 68 -
3.2.4	Die Akkumulation der Caspase-8-Prodomäne ist abhängig von Zellzyklus	- 71 -
3.2.5	Während der Mitose sind die Nuklei frei von Caspase-8	- 74 -
3.2.6	Caspase-8 wird Zellzyklus-abhängig durch eine Caspase proteolytisch prozessiert	- 74 -

3.2.7 Caspase-8 wird Zellzyklus-abhängig enzymatisch aktiviert	- 76 -
3.2.8 Caspase-8 ist für die Reparatur von DNA-Schaden notwendig	- 77 -
4 Diskussion	- 79 -
4.1 Caspase-3 spaltet XIAP in einem regulatorischen <i>Feedback-loop</i> zur synergistischen Induktion von Apoptose.....	- 79 -
4.1.1 Zusammenfassung	- 81 -
4.2 Weitere Funktion der Caspase-8	- 83 -
4.2.1 Zusammenfassung	- 87 -
Abbildungsverzeichnis	- 88 -
Tabellenverzeichnis	- 91 -
Literaturverzeichnis	- 92 -
Anhang	- 105 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Apaf-1	<i>capoptotic protease activating factor 1</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
Asp (D)	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
BCC	<i>basal cell carcinoma</i> (Basalzellkrebs)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BH's	<i>Bcl-2 homolgy domains</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin / Rinderserumalbumin
bsw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CIAA	Chlorophorm-Isoamylalkohol
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD95	<i>cluster of differentiation 95 (Fas)</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
c-FLIP _L	<i>cellular-FLIP long</i>
clAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
cm ²	Quadratcentimeter
Co	<i>Control</i> (Kontrolle)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
Cys	Cystein
Cyt C	Cytochrom C
D	Aspartat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
Diablo	<i>direct IAP binding protein with low PI</i>
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphospat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DR	<i>death receptor</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas associated protein with death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme</i>
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
GIT	Guanidinthiocyanat
G	Guanin
Gly, G	Glycin
h	<i>hour (Stunde)</i>
H-Brücken	Wasserstoffbrückenbindungen
HDAC7	<i>Histone deacetylase 7</i>
HM	hochaggressives Melanom

hnRNPs	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
His	Histidin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
iz-TRAIL	Isoleuzin-Zipper-TRAIL
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Lysin
KAc	Kaliumazetat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kpb	Kilobasenpaare
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molar
mA	milliampere
max.	maximal
μF	Mikrofarad
mg	Milligramm
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mJ	<i>millijoule</i>
mM	millimolar
MM	metastatisches Melanom
μM	Mikromolar
mRNA	<i>messenger ribonucleinacid</i>
MTS	<i>mitochondrial target sequence</i>

MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
NaAc	Natrium-Acetat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i>
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
nm	Nanometer
NMSC	<i>non melanoma-skin cancer</i> (weißer Hautkrebs)
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm Wellenlänge
OPG	<i>soluble receptor osteoprotegrin</i>
PABP	<i>poly-(A)-binding proteins</i>
PAK-2	<i>p21 activated kinase-2</i>
PAI-2	<i>Plasminogen activator inhibitor-2</i>
PARP 2	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 2
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIPES	<i>piperazine-N,N'-bis(2-ethansulfonic acid)</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RE	Restriktionsenzym
RGP	<i>Radial growth phase</i> (Radiale Wachstumsphase)
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SCC	<i>squamous cell carcinom</i> , Stachelzellkarzinom
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smac	<i>second mitochondria derived activator of apoptosis</i>
sog.	sogenannt
Ser	Serin
Src	Sarcoma
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCM	Tris–Calcium–Magnesium
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
T-Zellen	T-Lymphozyt-Zellen
U	Unit
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>Ubiquitin acceptor site</i>
UE	Untereinheit
ÜS	Überstand
UVB	Ultraviolett B
V	Volt

VGP	<i>Vertical growth phase</i> (Vertikale Wachstumsphase)
Wt	Wildtyp
XIAP	<i>x-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
w/o	<i>without</i> (unstimuliert)
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Das maligne Melanom zählt auch heute noch zu den gefährlichsten und tödlichsten Krebserkrankungen weltweit. Eukaryote Zellen stellen ein vielschichtiges multifaktorielles System dar, in welchem die Summe aus pro- und anti-apoptotischen Proteinen im Kontext der zellulären Gesamtsituation über das Schicksal der einzelnen Zelle zugunsten des gesamten Organismus entscheidet. Dieser Entscheidung liegt ein komplexes und mannigfaltiges System zugrunde, in dem eine Vielzahl von Variablen und Faktoren moduliert und reguliert werden. Das Verständnis dieser zugrundeliegenden molekularen Mechanismen stellt das Fundament zur Bekämpfung dieser tödlichen Krankheit dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der XIAP-Caspase-3-*crosstalk* das Schlüsselmoment der Entscheidung zwischen Leben und Sterben in humanen Melanomzellen darstellt. Initial TRAIL-resistente Melanomzellen können durch eine sublethale UVB-Bestrahlung für diese Rezeptor-vermittelte Apoptose sensitiviert werden. Dabei wird eine Beteiligung des intrinsischen mitochondrialen Apoptosewegs und den damit assoziierten pro-apoptotischen Faktoren nachgewiesen. Die Antagonisierung des anti-apoptotischen XIAP-Proteins führt zur vollständigen katalytischen Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und resultiert final in einem positiven regulatorischen *feedback-loop*, in dem Caspase-3 durch proteolytische Spaltung die Degradierung des XIAP-Proteins initiiert.

Zudem kann in der vorliegenden Arbeit eine weitere essentielle Funktion für Caspase-8 nachgewiesen werden. Diese vermeintlich ausschließlich pro-apoptotische Initiator-Caspase demonstriert eine fundamentale Bedeutung zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase in humanen Melanomzellen. Neben ihrer etablierten Rolle bei der Initiierung der Rezeptor-vermittelten Apoptose zeigt sich diese Protease als essentiell für die Progression durch die S-Phase des Zellzyklus. Dabei kann von einer Beteiligung der Caspase-8-Prodomäne an der DNA-Reparatur sowohl während der regulären DNA-Replikation als auch nach DNA-Schaden ausgegangen werden. Die Abwesenheit von Caspase-8 führt zur Arretierung humaner Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und resultiert in letzter Instanz in der Induktion des apoptotischen Zelltods über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg.

Abstract

Nowadays malignant melanoma are still among the most dangerous and deadly cancer in the world. Eukaryot cells represent a complex and multifactorially system, in which the total of all pro- and anti-apoptotic proteins decide in context of the cellular constitution about the fate of a single cell in favour of the whole organism. This decision is based on a very complex and multifaceted system, in which a wide range of variables and factors are tightly regulated. Understanding the underlying molecular mechanisms represents the basis to fight this fatal disease.

This work shows the crosstalk between XIAP and caspase-3 to be the key element of the decision between life and death in human melanoma. Initially TRAIL-resistant melanoma cells can become sensitized to receptor-mediated apoptosis by irradiation with a sublethal dose of UVB. In this process the participation of the intrinsic mitochondrial apoptosis signaling pathway, involving its associated pro-apoptotic factors, can be demonstrated. Antagonising the anti-apoptotic protein XIAP leads to fully activated effector-caspase-3 and finally results in a positive regulatory feedback-loop, in which caspase-3 initiates the degradation of XIAP in a direct cleavage event. Further, another essential function for the caspase-8 can be shown in this study. This supposed exclusive pro-apoptotic initiator-caspase demonstrates its fundamental importance for maintaining cellular homeostasis in human melanoma. Next to its established role in initiating the receptor-mediated apoptosis, this protease is essential for progression through the S-phase of cellcycle. The caspase-8-prodomain seems to be important for DNA-repair during regular DNA-replication as well as upon induction of DNA-damage. The absence of Caspase-8 leads to an arrest during the S-phase of cellcycle in human melanoma and finally results in the induction of apoptotic cell death via the intrinsic mitochondrial signaling pathway.

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut dient als größtes Organ des Körpers in erster Linie dem Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen wie beispielsweise chemischen, physikalischen und mikrobiellen Bedrohungen. Zudem reguliert die Haut aktiv den Wasserhaushalt des Körpers mit und bildet gleichzeitig einen wichtigen Teil des Immunsystems.

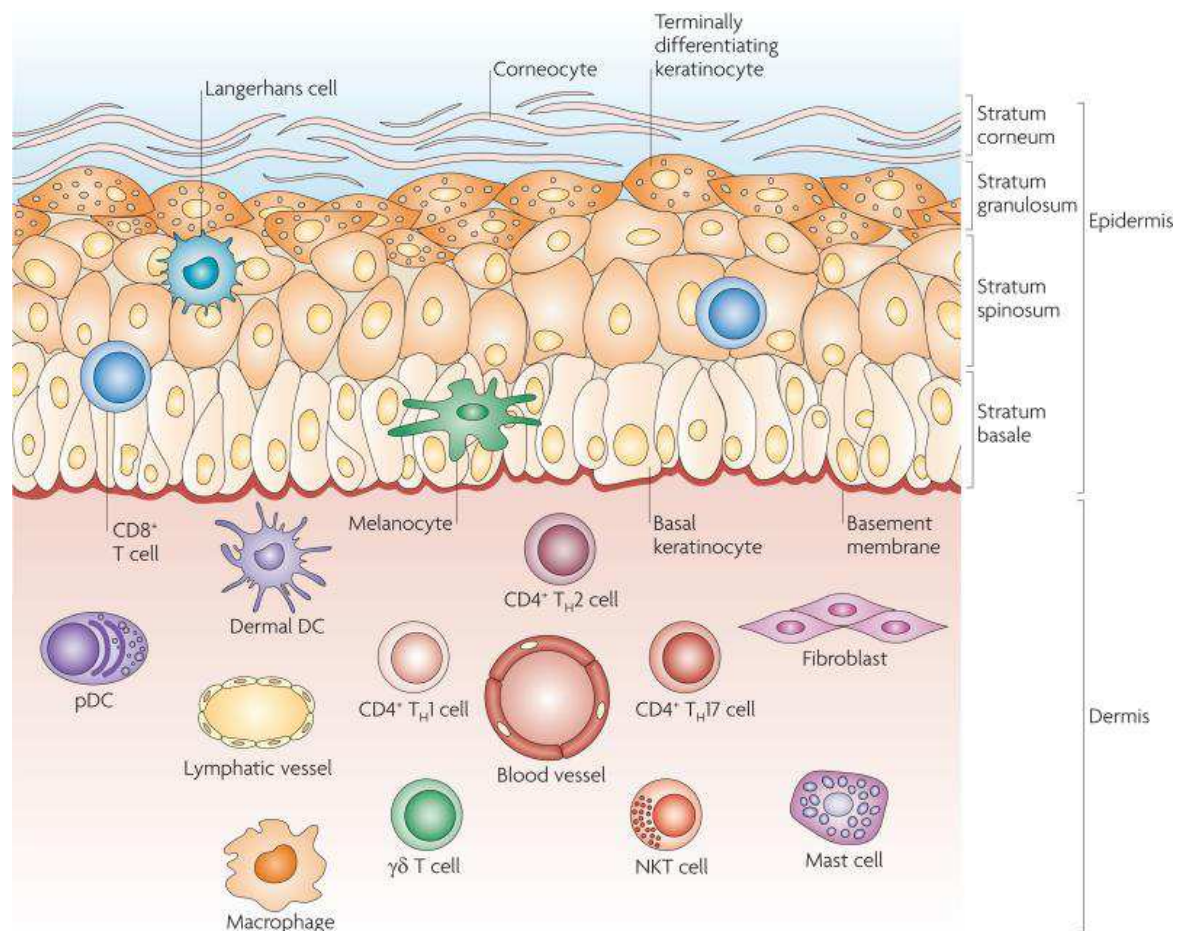


Abb. 1.1: Der Aufbau der Haut. Gezeigt wird der Aufbau der Dermis sowie der Epidermis mit den einzelnen Zellschichten. Zudem werden die bedeutendsten Immunzellen in der Haut dargestellt (Nestle et al., 2009).

Die Haut des Menschen baut sich aus einem äußeren Plattenepithel, der Epidermis, welche überwiegend aus Keratinozyten besteht und durch Differenzierung die funktionale Haut bildet, auf. Die tiefergelegene Dermis besteht aus einer Fibroblasten-Kollagen-Matrix und hat vor allem strukturgebende Funktion. Beide Schichten werden durch eine Basallamina getrennt, auf welcher eine weitere bedeutende Zellart – die Melanozyten – aufliegen. Melanozyten sezernieren das

Pigment Melanin als Schutz des umliegenden Gewebes vor UV- (Ultraviolett) Strahlung (Miyamura et al., 2007). Da unsere Haut in ständigem Kontakt mit der Umwelt steht, wird sie kontinuierlich mit Antigenen und Mikroben konfrontiert, weshalb sie auch als Immunbarriere fungiert und zu diesem Zweck antimikrobielle Peptide produziert, sowie verschiedene Arten von Inflammasomen enthält. Somit repräsentiert die Haut einen bedeutsamen Teil des Immunsystems. Dermis und Epidermis beherbergen vorwiegend in dem *Stratum basale* sowie dem *Stratum spinosum* Langerhans-, NK- (*natural killer*), sowie CD8⁺-T-Zellen, die der Immunabwehr dienen (Krueger and Stingl, 1989). In der Haut müssen konstitutiv vielfältige desensitivierende Vorgänge stattfinden, um eine extensive, unangemessene Inflammation zu verhindern. Einer dieser Desensitivierungsvorgänge wird über den programmierten Zelltod - die Apoptose - vermittelt. Daher spielt hier die kontrollierte und nicht-inflammatorische Beseitigung beschädigter und/oder hypersensitiver Zellen eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung eines gesunden Organismus. Eine gestörte Zell-Homöostase bzw. Proliferation und Differenzierung verursacht eine Vielzahl von Hautkrankheiten wie Schuppenflechte, Dermatitis oder Hautkrebs (Declercq et al., 2011).

1.2 Entstehung von Hautkrebs

Hautkrebs gilt als eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit und wird ausgehend von den entartenden Ursprungszellen in Melanom (MSC, *melanoma-skin cancer*)- und Nicht-Melanom-Karzinome (NMSC, *non melanoma-skin cancer*) (= weißer Hautkrebs) unterschieden. Weißer Hautkrebs wird weiterhin in Basalzellkrebs (BCC, *basal cell carcinoma*) und das Stachelzellkarzinom (SCC, *squamous cell carcinoma*) differenziert (Carr et al., 2007; Qureshi et al., 2012). Trotz seiner sehr hohen Inzidenz, verläuft weißer Hautkrebs bei frühzeitiger Erkennung jedoch selten tödlich, da das Metastasierungspotential dieser beider Krebsarten sehr gering ist (Beckmann, 2011).

Der schwarze Hautkrebs (Melanom) hingegen, gilt als einer der tödlichsten Krebserkrankungen überhaupt. Melanome sind maligne Neubildungen, entstehend aus Melanozyten der Haut. Melanin ist in verschiedenen Konzentrationen in den Tumorzellen und der extrazellulären Tumor-Matrix enthalten, was dieser Tumorart seine charakteristische schwarze Farbe verleiht (Vijuk et al., 1998).

Grundsätzlich stellt sich Krebs als eine Krankheit dar, in der klonale Zellen konstitutiv proliferieren und expandieren, wodurch sie normale Gewebe infiltrieren und zerstören. Eine Voraussetzung zur Etablierung eines jeden Tumors sind daher Veränderungen in Signalwegen, welche die Zellproliferation und das Überleben regulieren (Evan and Vousden, 2001). Ein weiteres Charakteristikum humaner Krebstumoren ist eine gestörte zelluläre Differenzierung (Campisi et al., 2005). Anders als normale somatische Zellen sind transformierte Krebszellen in der Regel nicht abhängig von mitotischen Proliferationssignalen ihrer Umgebung (Schmitz et al., 2000). So können viele Krebszellen sogar autokrin Wachstumsfaktoren, sowie deren Liganden exprimieren (Hanahan et al., 2000). Zudem sind die meisten Krebszellen in der Lage, der natürlichen Wachstumsinhibition durch Mutation von einigen Schlüsselregulatoren zu entgehen (Yonish-Rouach et al., 1991; Wallace-Brodeur and Lowe, 1999). Des Weiteren zählen replikative Unsterblichkeit, eine Umprogrammierung des Energiestoffwechsels auf Glykolyse, die Fähigkeit zur Invasivität und Metastasierung sowie Induktion der Angiogenese zu den typischen Charakteristika von malignen Tumoren. Zur Etablierung von Tumoren müssen transformierte Zellen zudem Mechanismen entwickeln, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen. Optimalerweise werden deregulierte Zellen bereits frühzeitig durch das Immunsystem erkannt und beseitigt. Jedoch belegen mittlerweile einige Studien, dass tumorumgebende Immunzellen sogar noch zu einem gesteigertem tumoralen Potential transformierter Zellen beitragen können, indem sie Wachstumsfaktoren an das umliegende Gewebe sezernieren.

Maligne Tumoren sind komplexe Gewebe, die sich aus vielen unterschiedlichen Zelltypen zusammensetzen (Hanahan et al., 2000). Das umgebende Tumorstroma setzt sich aus zellulären, molekularen und mechanischen Komponenten zusammen, verändert sich im Verlauf der Tumorprogression und ist zudem gewebsspezifisch (Hellman and Rosenberg, 2009). Aufgrund dieser Komplexität müssen Tumoren immer auch in ihrem spezifischen Kontext betrachtet werden. Erfolgreiche Therapien erfordern eine genaue Untersuchung der individuellen Krebsart, die sich aus dem primären Tumorlokus sowie der klonalen Entstehungsgeschichte ergibt.

1.3 Das maligne Melanom

Das kutane maligne Melanom ist die Krebsart mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz in der weißen Bevölkerung. Die Häufigkeit des Vorkommens ist eng korreliert mit der Hautfarbe und hängt von der Intensität der UV-Strahlenbelastung (geographischer Breitengrad) ab. (Vries et al., 2003; Mallone et al., 2011). Des Weiteren besteht ein nachgewiesener Zusammenhang zwischen der Anzahl vorhandener melanozytärer oder bereits dysplastischer Nävi mit dem Risiko am schwarzem Hautkrebs zu erkranken (Holly et al., 1987; Fabbrocini et al., 2011).

Typischerweise lassen für den Verlaufs der malignen Transformation fünf Entwicklungsstadien definieren: aus einem kongenitalen Nevus mit strukturell normalen Melanozyten entwickelt sich zunächst ein dysplastischer Nevus mit strukturellen und architektonischen Auffälligkeiten der Melanozytenpopulation. Es folgt die frühe radiale Wachstumsphase (*radial growth phase* = RGP), in welcher sich die transformierten Melanozyten lateral in der Epidermis ausbreiten. In der anschließenden vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase* = VGP) infiltrieren maligne Melanomzellen bereits das tiefergelegene dermale Gewebe und weisen somit schon Metastasierungspotential auf. Das metastasierende Melanom (MM) stellt die letzte Stufe in der Entwicklung dieser Tumorerkrankung dar (Nesbit et al., 1998). Die häufigsten Loci für Primär-Metastasen sind die regionalen Lymphknoten sowie die Haut selbst. Nachfolgende Metastasen können praktisch in alle Organe des Körpers streuen. Während früh-diagnostizierte Melanome sehr erfolgreich durch operative Eingriffe bekämpft werden können, weisen Patienten mit bereits regional befallenen Lymphknoten eine sehr schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 20 – 50 % auf. Bei Patienten mit Streuung über die Blutgefäße ist diese sogar noch drastisch schlechter (5 %) (Morton et al., 2002).

Aufgrund dieser hohen Mortalitätsraten und immer noch sehr begrenzten effektiven Therapiemöglichkeiten des malignen Melanoms, stellt das Verständnis molekularer Vorgänge während der Melanomprogression, neben einer umfassenden Sensibilisierung und Aufklärung der Bevölkerung für Risikofaktoren, eine der wichtigsten Waffen im Kampf gegen Hautkrebs dar.



Abb. 1.2: Die Progression eines malignen Melanoms mit Verlauf durch die einzelnen Phasen.

Als einer der Hauptrisikofaktoren zur Ausbildung eines malignen Melanoms zählt die intensive Exposition mit UV-Strahlung. UV-Strahlung umfasst einen Bereich kurzwelliger Strahlung des sichtbaren Lichtes von 400 - 100 nm und unterteilt sich in UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) und UVC (100 - 280 nm). Es gelangt nur ein geringer Teil der UVB-, jedoch die gesamte UVA-Strahlung durch die Erdatmosphäre. 90 % der UVB-Strahlung, ebenso wie der gesamte UVC-Anteil werden von der Ozonschicht, Wasserdampf sowie von Sauerstoff- und Kohlenstoff-Dioxiden absorbiert (Acosta et al., 2002; Takahashi et al., 2012). UVB-Strahlung ist aufgrund ihrer energiereichen kurzwelligen Strahlung sowie ihrer Eindringtiefe in die Haut von größerer biologischer Bedeutung als die langwelligere UVA-Strahlung. So steht vor allem UVB-Strahlung im Verdacht, die Bildung von Hautkrebs zu begünstigen (Matsumura and Ananthaswamy, 2004), das Immunsystem zu supprimieren (Aubin, 2003; Halliday et al., 2011), sowie inflammatorische und apoptotische Signalwege zu induzieren (Kulms and Schwarz, 2000). Durch Exposition mit UVB-Strahlung kommt es in der DNA zur Bildung von sogenannten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) sowie zu [6-4]-verknüpften Photo-Produkten (Kulms et al., 1999; Nakajima et al., 2004).

Erfolgt die daraufhin initiierte DNA-Reparatur nicht suffizient, kann die geschädigte Zelle durch Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalweges (siehe auch 1.7) eliminiert werden. Verläuft einer dieser beiden Mechanismen nicht adäquat, kann dies zur Entartung und somit zur Entstehung von Krebs beitragen.

1.4 Apoptose - der programmierte Zelltod

Apoptose ist einer der häufigsten Formen des Zelltodes in mehrzelligen Organismen und spielt eine entscheidende Rolle für die normale Entwicklung und Regulation verschiedenster physiologischer Prozesse (Fulda et al., 2009). In Anbetracht dessen ist es nicht überraschend, dass eine unangemessene Apoptoserate an einer Vielzahl pathologischer Prozesse wie bsw. akuten neurologischen Krankheiten (z.B.

Alzheimer, Huntington, Parkinson) und immunologischen Erkrankungen, erworbenen Immundefizienz-Krankheiten sowie an der Karzinogenese beteiligt ist (Zimmermann et al., 2001; Fuentes-Prior et al., 2004).

Charakteristischerweise lassen sich für den programmierten Zelltod sowohl morphologische, als auch biochemische Veränderungen in den sterbenden Zellen ausmachen. Apoptotische Zellen weisen Kondensation ihres Chromatins auf, verlieren ihre Adhäsionskontakte, wodurch sie sich abrunden und schrumpfen und letztendlich das typische als „blebbing“ bezeichnete Abschnüren von Membranvesikeln zeigen.

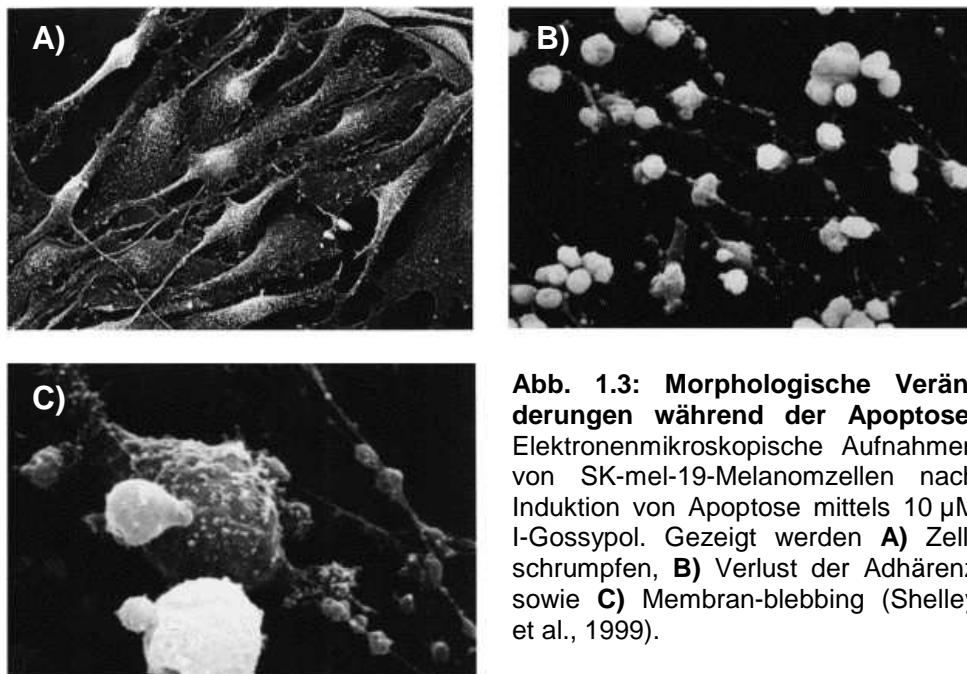


Abb. 1.3: Morphologische Veränderungen während der Apoptose. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SK-mel-19-Melanomzellen nach Induktion von Apoptose mittels 10 μ M I-Gossypol. Gezeigt werden **A)** Zellschrumpfen, **B)** Verlust der Adhärenz sowie **C)** Membran-blebbing (Shelley et al., 1999).

Biochemisch kann Apoptose durch DNA- und Oligonukleosomen-Fragmentierung (nukleäre Pyknosis), Phosphatidyl-Serin-Externalisierung und der proteolytischen Spaltung intrazellulärer Substrate nachgewiesen werden. Bedeutend ist auch die anschließende schnelle Phagozytose durch Makrophagen und/oder parenchymalen Zellen zugunsten des umliegenden Gewebes ohne Inflammation oder Aktivierung einer Immunantwort (Zimmermann et al., 2001; Li et al., 2008; Lynch et al., 2009).

1.5 Caspasen als Hauptmediatoren des programmierten Zelltodes

Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*) bezeichnet eine Familie von Cystein-Proteasen, welche in multizellulären Organismen hoch konserviert vorkommen und als zentrale Regulatoren des programmierten Zelltods gelten. Ihren

Namen verdanken sie einer Cystein-Seitenkette in ihrem katalytischen Zentrum, welche als Nukleophil während der Peptidbindungshydrolyse fungiert (Pop and Salvesen, 2009). Die Substratspezifität dieser Proteinklasse wird durch das Vorhandensein eines Aspartats (D) in der Substraterkennungssequenz vermittelt, hinter welchem die katalytische Spaltung erfolgt.

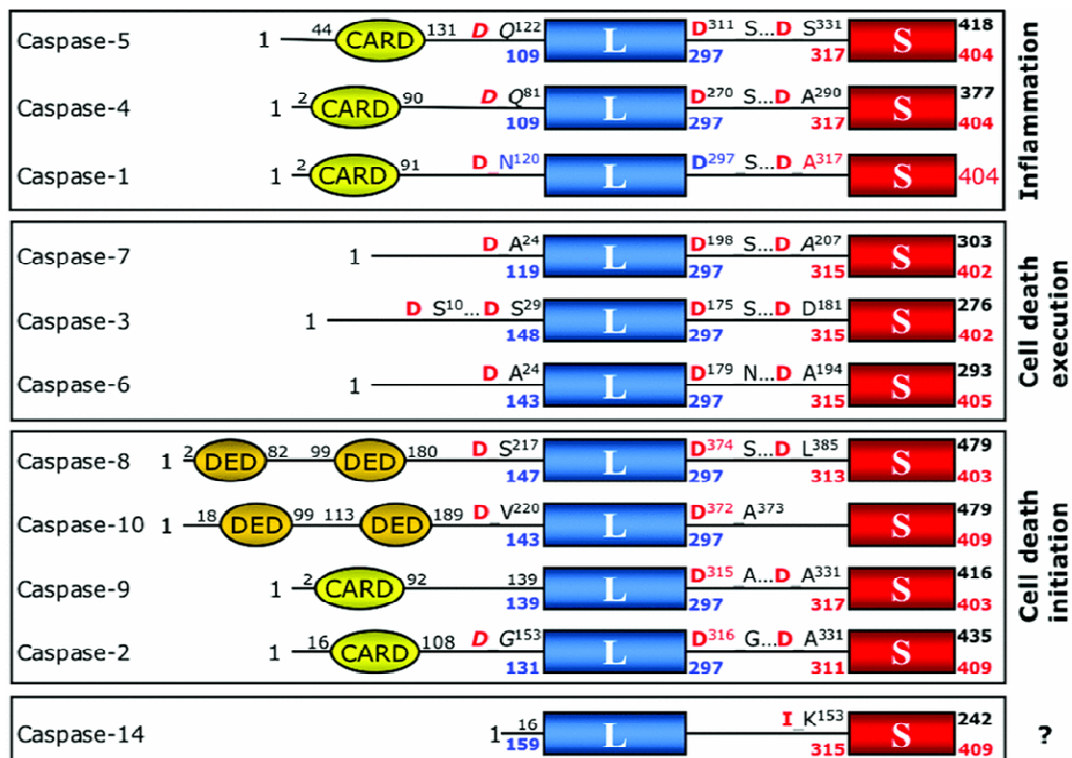


Abb. 1.4: Die Proteinfamilie der Caspasen. Caspasen können anhand ihrer Proteindomänen und Funktion in inflammatorische- und apoptotische Untergruppen unterteilt werden, wobei innerhalb der letzteren weiterhin Initiator- von Effektor-Caspasen unterschieden werden (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

Im Menschen wurden bislang 12 Caspasen identifiziert, die anhand ihrer Beteiligung an verschiedenen Signalwegen klassifiziert werden. Man unterscheidet vor allem inflammatorische (Caspase-1, -4, -5, -12) von apoptotischen Caspasen, wobei letztere Gruppe weiter in Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektor-Caspasen (Caspase -3, -6, -7) unterteilt wird. Eine Ausnahme hiervon stellt die Caspase-14, der bislang keine klar apoptotische bzw. inflammatorische Funktion zugewiesen werden konnte, dar (van Raam and Salvesen, 2011). Caspasen werden als inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene, exprimiert, die zur Aktivierung mehrere Prozessierungs- und Reifungsprozesse durchlaufen müssen. Allgemein besitzen Initiator-Caspasen eine lange (> 100 AS (Aminosäuren)) N-terminale Prodomäne, auf denen die Dimerisierungsdomänen (*death effector domain* = DED bei Caspase-8 und -10 bzw.

caspase recruitment domain = CARD bei Caspase-9) lokalisiert sind. Effektor-Caspasen weisen lediglich eine kurze (< 30 AS) Prodomäne auf und bedürfen daher zur Aktivierung einer proteolytischen Prozessierung (Thornberry et al., 1997). Initiator-Caspasen liegen im Gegensatz zu Effektor-Caspasen als Monomere in den Zellen vor. Nach Induktion eines entsprechenden Signalweges dimerisieren sie mittels ihrer N-terminalen Prodomäne und prozessieren sich daraufhin autokatalytisch, so dass das typische Caspase-Heterotetramer, bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten ($\alpha\beta\beta'\alpha'$) mit zwei katalytischen Zentren entsteht (Pop and Salvesen, 2009).

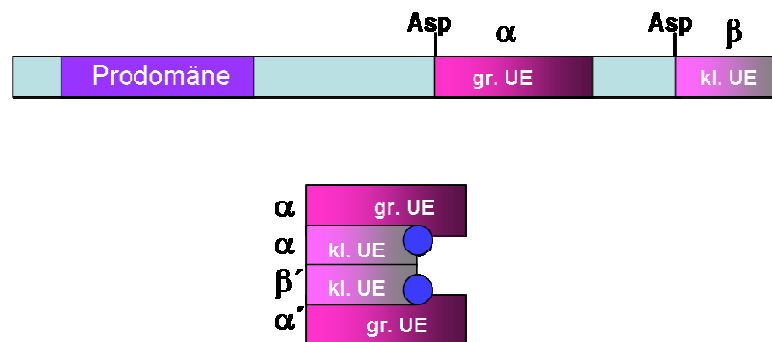


Abb. 1.5: Jeweils die funktionalen α - und β -Untereinheiten zweier Caspasemoleküle bilden nach Spaltung ein katalytisch aktives Heterotetramer. Die Prozessierungsstellen werden durch Aspartate gekennzeichnet, die beiden katalytischen Zentren einer aktiven Caspase werden durch blaue Kreise symbolisiert.

Mittlerweile wurde für beinahe jede Initiator- bzw. inflammatorische Caspase eine spezifische Dimerisierungsplattform identifiziert. Diese stellen in der Regel oligomere Proteinkomplexe dar, welche die Caspase-Moleküle in räumliche Nähe zueinander für die Aktivierung bringen (*proximity induced activation*) (Riedl and Salvesen, 2007). Eine weitere Besonderheit der Initiator-Caspasen besteht darin, dass bereits das Zymogen eine marginale katalytische Aktivität aufweist, da die Prozessierung autokatalytisch verläuft. Die proteolytische Prozessierung ist also für die enzymatische Aktivität nicht essentiell, führt jedoch zur Stabilisierung des aktiven Enzymkomplexes und zu einer enormen Potenzierung der katalytischen Aktivität (1:1000 für Caspase-8) (van Raam and Salvesen, 2011). Im Gegensatz dazu weisen die bereits als Dimer vorliegenden Effektor-Caspasen keinerlei katalytische Aktivität auf. Sie müssen von Initiator-Caspasen proteolytisch prozessiert werden, um ihre enzymatische Kompetenz zu erhalten (Zimmermann et al., 2001). Die Aktivierung von Caspasen erfolgt typischerweise über zwei Signalwege: Entweder nach

Ligandbindung an Todesrezeptoren über den extrinsischen Signalweg (1.6) oder durch intrinsische Faktoren wie bsw. DNA-Schaden über den sogenannten Mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg (1.7).

1.6 Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose: extrinsischer Signalweg

Todesrezeptoren gehören zur TNF- (*Tumor necrosis factor*) Rezeptor-Superfamilie und sind Typ I Transmembranproteine. Gemeinsam haben alle Mitglieder dieser Rezeptorfamilie eine ein bis sechs Cysteine-umfassende extrazelluläre Domäne. Die TNF-Rezeptorfamilie kann in drei Gruppen untergliedert werden: Die erste Gruppe beinhaltet Rezeptoren, welche intrazellulär über sogenannte TRAF- (*TNF receptor-associated factor*) Proteine signalisieren. Die zweite Gruppe umfasst "Decoy"-Rezeptoren, die entweder löslich vorliegen, oder keine funktionale intrazellulären Proteindomänen aufweisen, so dass Ligandbindung nicht zur Weiterleitung eines intrazellulären Signals führt. Die dritte Proteinuntergruppe stellen die klassischen Todesrezeptoren dar. Charakteristisch für diese ist die Präsenz einer intrazellulären Todesdomäne (*death domain* = DD) (Wallach et al., 1999; Zimmermann et al., 2001). Neben dem TNF-R1 wird vor allem auch durch die DD der Rezeptoren Fas/APO1/CD95 und die TRAIL/Apo-2L-Rezeptoren 1 und 2 die extrinsische Apoptose vermittelt (Schulze-Osthoff et al., 1998).

Durch Bindung des spezifischen Liganden (TNF, FasL, TRAIL) kommt es zunächst durch die Reorganisation der Todesrezeptor-Komplexen zu Oligomeren zu deren Aktivierung (Chan et al., 2007). Intrazellulär erfolgt daraufhin die Assemblierung eines DISC (*death inducing signaling complex*) durch Rekrutierung des Adaptorproteins FADD (*Fas associated protein with death domain*), sowie der Initiator-Caspase-8. Diese Interaktion wird mittels homophiler DED's (*Death effector domains*) vermittelt (Krammer et al., 2003). In Typ I Zellen führt die Rekrutierung ausreichender Mengen von Caspase-8 an den DISC zu deren autokatalytischer Aktivierung, wodurch diese in der Lage ist, *downstream*-liegende Effektor-Caspasen direkt durch proteolytische Spaltung zu prozessieren und somit zu aktivieren. Typ II-Zellen benötigen aufgrund der geringeren Konzentration aktivierter Caspase-8 zusätzlich den mitochondrialen intrinsischen Amplifikationsweg, um effizient Apoptose zu induzieren. Hierfür wird das Protein Bid (*BH3 interacting domain death*

agonist) von Caspase-8 proteolytisch in tBid (*truncated Bid*) prozessiert. Dieses Spaltprodukt transloziert daraufhin zu den Mitochondrien, wo es anti-apoptische Proteine der Bcl-2- (*B-cell lymphoma-2*) Familie antagonisiert und die pro-apoptischen Bcl-2 Proteine Bax (*Bcl-2 associated protein X*) und Bak (*Bcl-2 antagonist killer*) aktiviert. Die Aktivierung führt zur Homo-Oligomerisierung von Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran (Wei et al., 2000; Antonsson et al., 2000) und führt so durch Zerstörung des Transmembranpotentials ($\Delta\psi_M$) zu deren Permeabilisierung (Wang et al., 2001). Dies bewirkt die Freisetzung löslicher Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytoplasma (Launay et al., 2005). Freigesetztes Cyt C (Cytochrom C) führt nach Bindung an das im Zytosol vorliegende Apaf-1- (*apoptotic protease activating factor 1*) Protein unter ATP- (Adenosintriphosphat) Verbrauch zu dessen heptameren Oligomerisierung (Boatright et al., 2003). Apaf-1 besitzt N-terminal eine CARD- (*caspase recruitment domain*) Domäne, mittels welcher es die Initiator-Caspase-9 rekrutiert, was zu deren autokatalytischen Aktivierung führt (Salvesen 1999; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Aktive Caspase-9 wiederum prozessiert und aktiviert daraufhin *downstream* Effektor-Caspasen und trägt somit zur Exekution von Apoptose bei. Vor allem eine vollständige Prozessierung der Effektor-Caspase-3 gilt als "*point of no return*", da wenige, jedoch für den Zellmetabolismus essentielle Substrate proteolytisch eliminiert werden und so die Zelle unwiderruflich dem Zelltod entgegen geführt wird (Yan and Shi, 2005).

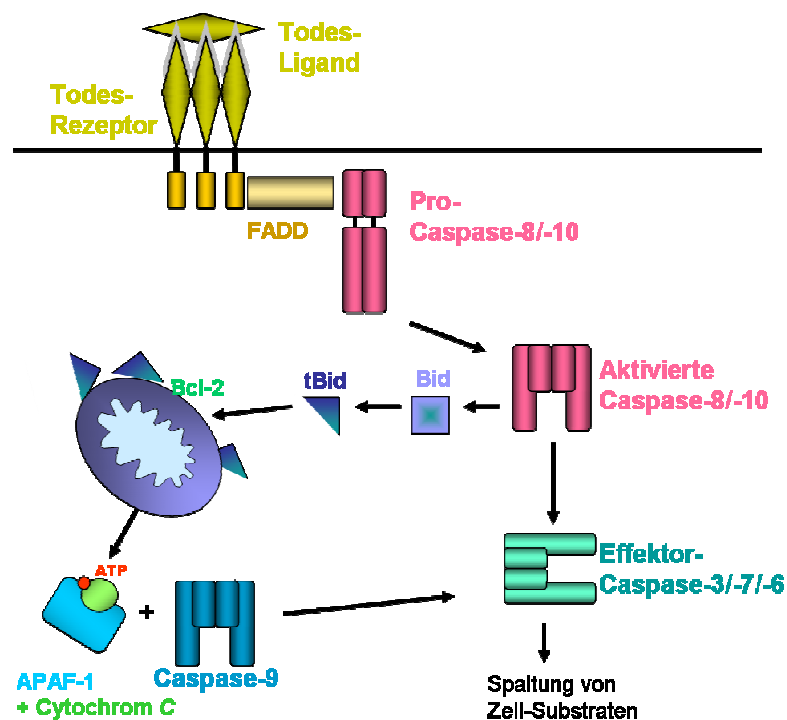


Abb. 1.6: Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose. Durch Bindung eines adäquaten Liganden an einen Todesrezeptor wird intrazellulär die Apoptose-Signalkaskade in Gang gesetzt. Die Aktivierung Rezeptor-assoziiierter Initiator-Caspasen führt zur direkten Prozessierung und Aktivierung von Effektor-Caspasen. Zusätzlich wird der intrinsische mitochondriale Amplifikationsweg durch Spaltung von Bid zugeschaltet.

1.7 Die Mitochondrial-vermittelte Apoptose: Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Apoptose-Signalweg kann unabhängig von extrinsischen Faktoren, durch intrinsische Faktoren induziert werden. Hierzu gehören beispielsweise DNA-Schädigung oder oxidativer Stress (Wang et al., 2001). In diesem Signalweg kommt dem Transkriptionsfaktor p53 eine Schlüsselrolle zu. p53 gilt als klassischer Tumorsuppressor, da er abhängig vom Ausmaß des DNA-Schadens die Expression proapoptotischer Faktoren, vor allem solcher der Bcl-2-Familie (Yu and Zhang, 2003; Yu and Zhang, 2005), transaktivieren kann. Dies resultiert in einer Dysfunktion der Mitochondrien, Freisetzung weiterer pro-apoptotischer Faktoren (unter anderem Smac/Diablo und Cytochrom C), der Aktivierung von Caspasen und somit in der Exekution von Apoptose (Kastan et al., 1995; Velculescu and El-Deiry, 1996; Moll and Schramm, 1998; Fridman and Lowe, 2003).

1.8 Der Todesligand TRAIL als Tumorthapeutikum

TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) (auch TL2, APO2L, CD253, TNFSF10) unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern der TNF-Ligand-familie durch die ihm zugesprochene Tumorselektivität. TRAIL kann fünf Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie binden (TRAIL-R1, -R2, *soluble receptor osteoprotegerin* (OPG), TRAIL-R3 und -R4) und gilt als einer der Hoffnungsträger in der modernen Krebstherapie. Lediglich TRAIL-R1 und R2 verfügen über eine funktionale intrazelluläre DD und signalisieren nach Ligandbindung für Apoptose. Die übrigen Mitglieder dieser Rezeptor-Familie binden zwar den TRAIL-Liganden, leiten das Signal intrazellulär aber nicht weiter.

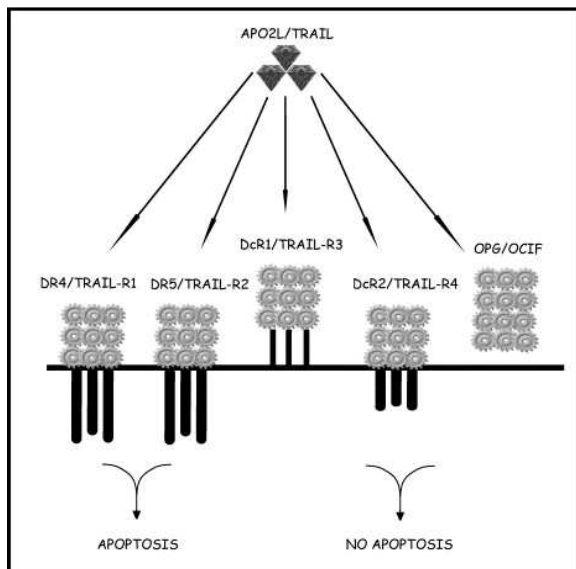


Abb. 1.7: TRAIL und seine Rezeptoren. TRAIL ist ein homotrimerer Todesligand, der an fünf verschiedene Rezeptoren binden kann. TRAIL-R1 und TRAIL-R2 besitzen eine intrazelluläre DD und signalisieren nach Ligandbindung für Apoptose. TRAIL-R3 ist über ein Glykophosphatidylinositol an die Plasmamembran gekoppelt und weist keine Signalfunktion auf. TRAIL-R4 besitzt lediglich eine trunke, nicht-funktionale intrazelluläre DD und kann somit ebenfalls nicht für Apoptose signalisieren. OPG ist eine lösliche Form des TRAIL-Rezeptors, dessen genaue Funktion derzeit noch unklar ist (Altucci and Gronemeyer, 2004).

Jedoch zeigen viele Primärtumoren nur geringfügige Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose oder entwickeln während der Therapie eine TRAIL-Resistenz aus (Igney and Krammer, 2002; Koschny et al., 2007; Dyer, 2007; Todaro et al., 2008). In früheren Studien wurde vermutet, dass diese Resistenz durch Bindung des Liganden an die intrazellulär nicht-signalisierende *Decoy*-Rezeptoren zustande kommt. Jedoch konnte mittlerweile belegt werden, dass die TRAIL-Suszeptibilität von Melanomzellen nicht mit Expression unterschiedlicher TRAIL-Rezeptoren korreliert (Thayaparasingham, 2009). Vielmehr wird intrazellulär auf molekularer Ebene durch ein vielschichtiges und komplexes Signalnetzwerk entschieden,

ob eine Zelle nach TRAIL-Bindung den apoptotischen Zelltod exekutiert oder sich diesem entziehen kann. Das Verständnis dieser intrazellulären Mechanismen sowie deren funktionalen Zusammenhänge stellen somit die entscheidende Grundlage für

eine mögliche Sensitivierung bzw. Re-Sensitivierung von Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose im Kampf gegen den schwarzen Hautkrebs dar.

1.9 Regulation des apoptotischen Zelltods

Apoptose stellt sich als ein hochkomplexes und multifaktorielles System dar, in dem die Summe aller pro -und anti-apoptotischer Faktoren, sowie der allgemeine intra- wie auch interzelluläre Kontext über das Schicksal einer Zelle entscheidet.

Aufgrund ihrer enormen Bedeutung für einen gesunden Organismus ist es nicht verwunderlich, dass es eine Vielzahl Modulations- und Regulationsmechanismen in diesem System gibt. Für die vorliegende Untersuchung pro- und anti-apoptotischer Signalwege in humanen Melanomzellen haben sich die IAP-Proteine, ebenso wie Smac/Diablo als besonders bedeutend herausgestellt.

1.9.1 *Inhibitors of apoptosis proteins – IAP´s*

Die Familie der IAP´s wurde zuerst in Baculoviren entdeckt, wo sie Apoptose der Wirtszellen inhibieren (Crook et al., 1993; Birnbaum et al., 1994; Zimmermann and Green, 2001). Ihre Homologe wurden in vielen Tieren inklusive Säugern gefunden (Deveraux and Reed, 1999; Miller et al., 1999). In Mammalia umfasst die Proteinfamilie bis dato acht Mitglieder. Die prominentesten Vertreter sind cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis protein*) 1 und 2 sowie das XIAP- (*x-linked inhibitor of apoptosis protein*) Protein (Igney and Krammer, 2002). IAP´s fungieren als wichtige Schlüsselregulatoren bei der Entscheidung zwischen Leben und Tod einer Zelle, vornehmlich über die Kontrolle von Caspasen (Lopez and Meier, 2010).

Charakteristischerweise tragen alle Mitglieder dieser Familie eine oder mehrere Cystein- und Histidinreiche Homologiedomänen (*baculoviral IAP Repeat* = BIR-Domäne), die grundsätzlich Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Die Bindungseigenschaften entsprechender BIR-Domänen in Multi-BIR-tragenden Proteinen sind konserviert. BIR2 und BIR3 vermitteln die Bindung an Caspasen und Apoptoseregulierenden Proteinen, BIR1 hingegen interagiert mit diversen Signaltransduktions-Intermediaten (Samuel et al., 2006; Lu et al., 2007; Srinivasa et al., 2008). Einige Vertreter der IAP-Familie tragen zudem eine RING- (*really interesting new gene*) Domäne, welche ihnen E3-Ubiquitinligase-Aktivität verleiht (Yang, 2000a; Suzuki et

al., 2001). Ub (Ubiquitin) ist ein kleines modifizierendes Protein, welches kovalent an Zielproteine gekoppelt wird. E3-Proteine vermitteln dabei die Substratspezifität und ermöglichen eine kovalente Verknüpfung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und dem N-Terminus eines Lysinrests im Substrat. IAP's vermitteln unter anderem die Bindung von K48-verknüpften Ubiquitinen, was eine Erkennung und Abbau des Substrats durch das 26S-Proteasom vermittelt, und so die Proteinkonzentration in der Zelle reguliert (Xu et al., 2009). Zusätzlich besitzen sowohl cIAP1,2 als auch XIAP eine UBA- (*Ubiquitin acceptor site*) Domäne, die es ihnen ermöglicht, selbst Ub-Ketten zu binden (Gyrd-Hansen et al., 2008).

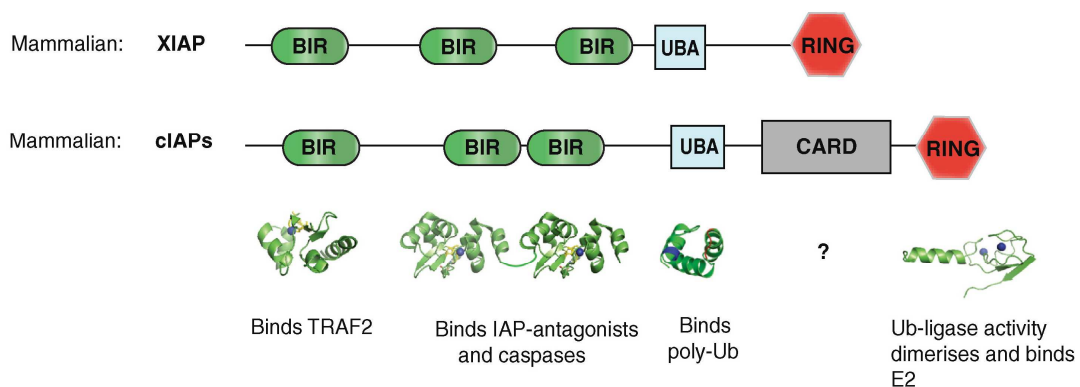


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der konservierten IAP-Proteindomänen. Gezeigt werden die wichtigsten funktionalen Proteindomänen der IAP-Proteine in Säugetieren sowie deren Funktion, falls bekannt (Lopez and Meier, 2010).

Neben anderen zellulären Aufgaben, verfügen cIAP's sowie XIAP über die Kapazität den pro-apoptotischen Faktor Smac/Diablo nach Freisetzung aus den Mitochondrien zu antagonisieren. Diese Interaktion erfordert eine direkte Bindung und führt zu dessen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradierung (Eckelman et al., 2006). XIAP gilt als der potenteste Inhibitor von Apoptose (Eckelman and Salvesen, 2006a; Eckelman et al., 2006) und scheint das einzige IAP zu sein, welches die Caspaseaktivität direkt inhibieren kann (Eckelman et al., 2006). XIAP kann über seine BIR3-Domäne direkt an Caspase-9 binden und sie durch einen allosterischen Mechanismus in ihre monomere, inaktive Form zwingen (Shiozaki et al., 2003; Shiozaki and Shi, 2004). Die Bindung mittels BIR2-Domäne sowie der Interlinkersequenz zwischen BIR1 und BIR2 an Caspase-3 und -7 hingegen stellt eine direkte kompetitive Hemmung dar (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Eckelman and Salvesen, 2006b; Pop and Salvesen, 2009).

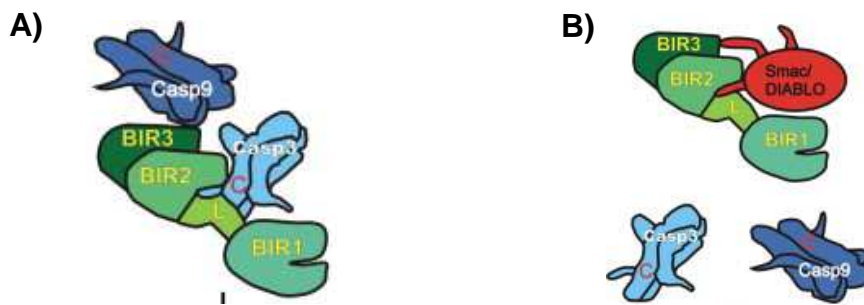


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Interaktion von XIAP mit Caspasen bzw. Smac/Diablo. A) XIAP-vermittelte Inhibition von Caspasen. XIAP bindet Caspase-9 über seine BIR-3-Domäne, Caspase-3 und -7 (hier nur Caspase-3 exemplarisch dargestellt) hingegen über seine Linkerdomäne zwischen BIR1 und BIR2 sowie der BIR2-Domäne. **B) Smac/Diablo antagonisiert die XIAP-vermittelte Caspase-Inhibition.** Smac/Diablo verdrängt die Caspasen von den Bindestellen in XIAP durch direkte Bindung der Interlinkerdomäne ebenso wie der BIR3-Domäne von XIAP, wodurch es zur vollständigen Aktivierung dieser Caspase und somit zur Induktion der Apoptose kommt (Rami et al., 2008).

Die Aktivierung von Caspasen verläuft nach einem zweistufigen Prozessierungsmechanismus. Im Falle von Caspase-3 bsw. erfordert eine vollständige katalytische Aktivierung nach initialer Spaltung zwischen den beiden katalytischen UE eine zweite Prozessierung innerhalb der großen UE. Dabei wird das katalytisch inaktive p21-Intermediat zu einem p17-Fragment mit enzymatischer Kapazität trunziert. Durch die direkte Bindung von XIAP an die teilprozessierte Caspase-3 wird deren finale Prozessierung und somit katalytische Aktivierung wirkungsvoll unterbunden (Han et al., 1997; Stennicke et al., 1998; Shi, 2002; Micheau and Mérino, 2004).

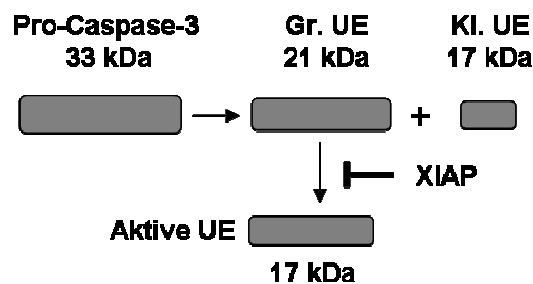


Abb. 1.10: XIAP verhindert durch direkte Bindung den aktivierenden Prozessierungsschritt von Caspase-3. XIAP bindet direkt an die teilprozessierte Caspase-3 p21-UE ohne katalytische Aktivität und verhindert somit wirkungsvoll dessen finale Prozessierung in die p17-UE mit enzymatischer Aktivität, wodurch die Exekution von Apoptose inhibiert wird.

Eine zentrale Rolle kommt auch der RING-Finger-Domäne von XIAP zu. Es konnte gezeigt werden, dass XIAP mit Hilfe dieser konservierten Domäne sowohl die aktiven Caspasen-3, -7 und -9 (Suzuki et al., 2001; Zhang et al., 2004), als auch reifes zytosolisches Smac/Diablo für den proteasomalen Abbau markieren kann und somit

wirkungsvoll deren pro-apoptotische Wirkung neutralisieren kann (Suzuki et al., 2001; MacFarlane et al., 2002; Hu and Yang, 2003).

1.9.2 Smac/Diablo

Smac/Diablo gilt als klassischer pro-apoptotischer Faktor. Dieses Protein wird mittels seiner N-terminalen MTS (*mitochondrial target sequence*) in den Inter-membranraum der Mitochondrien überführt, wo diese proteolytisch entfernt wird. Somit kann reifes Smac/Diablo bei Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ins Zytosol freigesetzt werden (Hunter et al., 2007). Dort bindet das aktive Smac/Diablo in dimerer Form an XIAP mit einer Stöcheometrie von 2:1 (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Huang et al., 2003). Durch kompetitive Bindung sowohl an die BIR3-Domäne als auch an die BIR2 von XIAP verdrängt es den Inhibitor von Caspase-9 bzw. den Effektor-Caspasen-3 und -7, bedingt so deren vollständige Prozessierung und erlaubt die Exekution von Apoptose (Chai et al., 2000; Srinivasula et al., 2001). Zusätzlich konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine direkte Bindung von Smac/DIABLO an XIAP dessen Autoubiquitinierung initiieren und somit zu dessen proteasomaler Degradierung beitragen kann (Fu et al., 2003; Fu et al., 2003b; Schile et al., 2008).

Auf diese Weise antagonisiert Smac/Diablo den anti-apoptotischen Effekt von XIAP sehr effektiv und fungiert somit als potenter pro-apoptotischer Faktor in der komplexen Apoptose-Maschinerie.

1.10 Apoptose-unabhängige Funktionen von Caspase-8

Aufgrund seiner unabdingbaren Funktion bei der Initialisierung und Promotion des Rezeptor-Vermittelten Apoptose-Signalwegs galt Caspase-8 lange als eindeutig und ausschließlich pro-apoptotische Protease. Allerdings werden in den letzten Jahren zunehmend Hinweise darauf gefunden, dass Caspasen im Allgemeinen, sowie Caspase-8 im Speziellen weitere essentielle Apoptose-unabhängige Aufgaben innehaben, die essentiell für die Zellhomöostase sind und gegebenenfalls sogar Überlebensnotwendig sein könnten. So wurde in diversen Krebsarten sogar eine Aufregulierung der Caspase-8-Aktivität dokumentiert (Shivapurkar et al., 2002; Helfer et al., 2006; Barbero et al., 2009; Fulda et al., 2009; Stupack et al., 2010).

Eine konstitutive Aufregulierung der Src- (Sarcoma) Kinase-Aktivität ist charakteristisch für eine Vielzahl von Krebsarten. Durch die Src-Kinase vermittelte Phosphorylierung wird durch Inhibition der autokatalytischen Aktivierung zwar die pro-apoptotische Wirkung von Caspase-8 unterbunden, nicht aber das Caspase-8-Protein depletiert. Dies könnte vor allem im Hinblick auf potentielle Überlebensfunktionen von Caspase-8 von elementarer Bedeutung sein und einer Krebszelle gleich einen doppelten Vorteil verschaffen: Die Rezeptor-Vermittelte Apoptose wird umgangen und gleichzeitig eine unverhältnismäßige Proliferationsrate bzw. ein Überlebensvorteil gefördert (Fulda et al., 2009).

Auch für die Malignität von Tumoren spielt Caspase-8 vermutlich eine ausschlaggebende Rolle. Caspase-8 ist für die optimale Aktivität von Calpainen, Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) und die Lamellopodien-Assemblierung erforderlich. Vor allem durch seine aktivierende Wirkung auf Calpaine, welche maßgeblich an der Zellmotilität und -invasivität beteiligt sind, könnte Caspase-8 das Metastasierungspotential von malignen Tumoren signifikant erhöhen (Helfer et al., 2006).

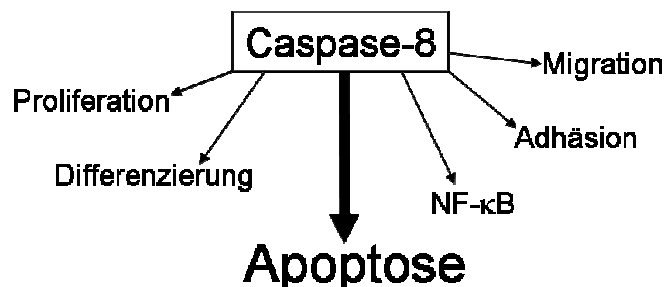


Abb. 1.11: Übersichtsschaubild von Caspase-8-Funktionen. Neben seiner bekanntesten Aufgabe, der Induktion des apoptotischen Zelltods, erfüllt Caspase-8 weitere vielfältige Aufgaben zur Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichts in eukaryoten Zellen. Dazu gehören: Zellproliferation und -differenzierung, Migration und Adhäsion von Zellen.

Die Regulation alternativer Caspase-8-Funktionen erweist sich jedoch als sehr komplex und vielfältig. Beispielsweise demonstriert am DISC lokalisierte Caspase-8 ein anderes Substratspektrum als die freigesetzte, vollständig aktivierte Form. Als Substrat für die unprozessierte Caspase-8 konnten bislang nur die Caspase-8 selbst, sowie sein nahes Paralog FLIP_L (*FLICE-like inhibitory protein_{long}*) nachgewiesen werden (Chang et al., 2003; Hughes et al., 2009). Die aktive dimerisierte Caspase-8-Form hingegen spaltet keine Caspase-8-Moleküle, sondern ausschließlich Effektor-Caspasen (Lavrik et al., 2003), sowie eine Reihe weiterer Zielproteine unter-

schiedlichster Proteinklassen wie beispielsweise Bid, HDAC7 (*Histone deacetylase 7*) (Verdin et al., 2003), PARP2 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 2) (Benchoua et al., 2002), hnRNPs (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), PAK-2 (*p21 activated kinase-2*), PAI-2 (*Plasminogen activator inhibitor-2*) oder α -Tubulin (Fischer et al., 2003; Cathelin et al., 2006; Timmer and Salvesen, 2007). Im Zusammenhang mit ihrem differenziellen Wirkungsspektrum wird Caspase-8 in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten gefunden. Neben seinem vorrangigen Aufenthaltsort, dem Zytosol (Medema et al., 1997), wurde Caspase-8 bislang unter Anderem auch über den Nukleus verteilt, in Aktinreichen "Ruffles" (Barbero et al., 2008), Endosomen (Lee et al., 2006), *Focal Adhesions* (Barbero et al., 2009) sowie an Zentrosomen assoziiert (Mielgo et al., 2009) nachgewiesen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

WM-115 (RGP)

Dr. Friegegund Meier, Dermatologisches Institut, Universität Tübingen

WM-3211 (VGP)

Dr. Friegegund Meier, Dermatologisches Institut, Universität Tübingen

WM-852 (MM)

Dr. Friegegund Meier, Dermatologisches Institut, Universität Tübingen

2.1.2 Antikörper

anti- β -Aktin Ab-5 # 612656, *mouse*

BD Pharmingen™

anti-Bcl-2 # 2872, *rabbit*

Cell Signaling Technology®

anti-Caspase-3 # 9662, *rabbit*

Cell Signaling Technology®

anti-Caspase-6 # 9762, *rabbit*

Cell Signaling Technology®

anti-Caspase-8 # 55143, *mouse*

BD Pharmingen™

anti-Caspase-8 mAb (C15), *mouse*
Hybridoma-ÜS (HD)

Heidelberg

anti-Caspase-9 # 9502, *rabbit*

Cell Signaling Technology®

anti-Cytochrome C # 556433, *mouse*

BD Pharmingen™

anti-ECL *mouse* IgG HRP-linked,
NA931

Amerham GE Healthcare

anti-ECL *rabbit* IgG HRP-linked, # NA934

Amerham GE Healthcare

anti-FADD # 610399, *mouse*

BD Transduction Laboratories™

anti-FLAG M5 # F4042, *mouse*

Sigma-Aldrich

anti-Hsp60 # 611562, *mouse*

BD Transduction Laboratories™

anti-IgG-FITC # F9137, *mouse*

Sigma-Aldrich

anti-I κ B α (L35A5) # 4814, *mouse*

Cell Signaling Technology®

anti-*mouse* Alexa Fluor® 546 # A21143

Invitrogen

anti-c-myc <i>clone</i> 9E10 # MA1-980, <i>mouse</i>	<i>Thermo Scientific</i>
anti-PARP # 610716, <i>mouse</i>	<i>BD Pharmingen™</i>
anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (29E3) # 9718, <i>rabbit</i>	<i>Cell Signaling Technology®</i>
anti-Phospho-Histone H3 [pSer10] # H0412, <i>rabbit</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
anti- <i>rabbit</i> Alexa Fluor® 488 # A11094	<i>Invitrogen</i>
anti-Smac/Diablo # 2954, <i>mouse</i>	<i>Cell Signaling Technology®</i>
anti-XIAP # 610717, <i>mouse</i>	<i>BD Pharmingen™</i>

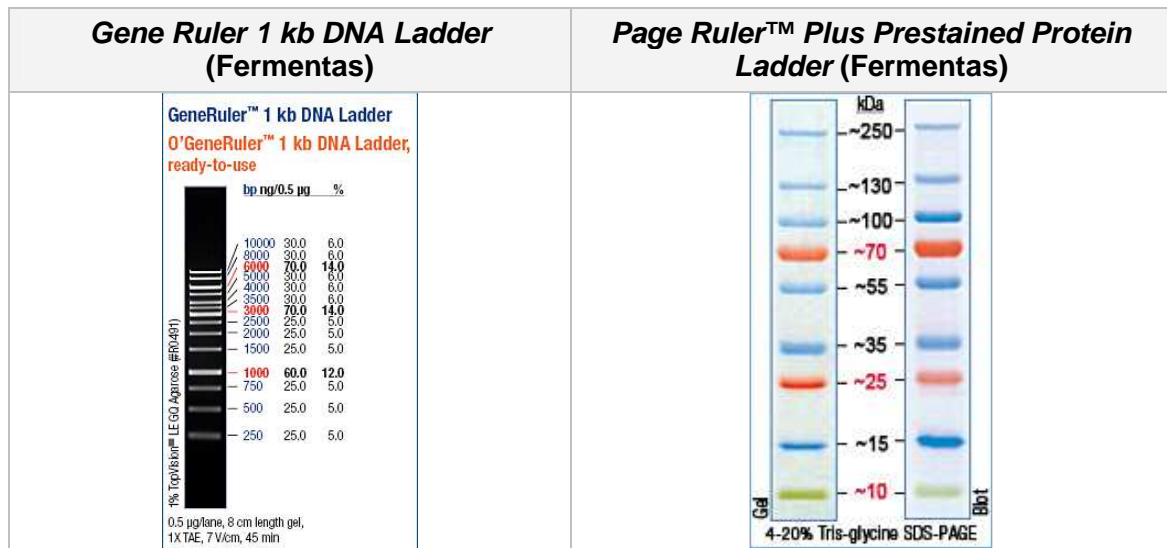
2.1.3 Enzyme

<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (1 U/μl)	<i>Fermentas</i>
<i>Expand High Fidelity Plus PCR System</i>	<i>Roche Diagnostics</i>
<i>KOD Hot Start DNA Polymerase</i> (1 U/μl)	<i>Novagen Toyoba</i>
Restriktionsendonukleasen (10 U/μl)	<i>Fermentas</i>
RNase A (DNase-free)	<i>AppliChem</i>
T4 DNA Ligase (1 U/μl)	<i>Roche Diagnostics</i>

2.1.4 Größenmarker für die Protein- und DNA-Elektrophorese

<i>GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder</i>	<i>Fermentas</i>
<i>Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	<i>Fermentas</i>

Tab. 2.1: Für die DNA-Elektrophorese und SDS-PAGE eingesetzten Größenmarker. Gezeigt werden die Bandenauffrennung der Marker-DNA bzw. Markerproteine in der Elektrophorese.



2.1.5 Geräte und Materialien

Agarosegel-Aparatur: <i>Sub-Cell® GT</i>	Bio Rad
Akrylamidgel-Aparatur: <i>Mini-Protean® 3 Cell</i>	Bio Rad
Begasungs-Inkubator 5 % CO ₂ ; 37°C	<i>VaroCell</i>
Blot Aparatur: Semi-Dry Blotter Pegasus	PHASE
<i>Cell culture dishes</i> (verschiedene Größen)	Greiner <i>Bio-one Cellstar®</i>
<i>Cell culture plate</i> (24/12/6-well)	Greiner <i>Bio-one Cellstar®</i>
<i>Cell Observer</i>	Carl Zeiss AG
<i>Cellstar® Tubes</i> 15/50 ml	Greiner <i>Bio-one</i>
Elektroporationsküvetten 4 mm <i>Electrode gap</i>	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH</i>
Elektroporationssystem <i>EasyjecT Plus</i>	<i>EquiBio</i>
<i>ELISA Reader</i> EL808	<i>BioTek</i>
Eppendorf <i>Research® Family Fix</i> (verschiedene Volumina)	Eppendorf
Erlenmeyer-Kolben (verschiedene Volumina)	Schott Duran
FACS Röhrcchen: Greiner <i>Bio-one</i> PS-Röhrcchen GLKL 5 ml	Greiner <i>Bio-one</i>

Filterip-Pipettenspitzen (verschiedene Volumina)	<i>Corning Incorporated</i>
<i>Fireboy eco</i>	<i>Tecnomara Integra Bioscience</i>
Fluoreszenzmikroskop DM IRB	Leitz
Durchflußzytometer Beckmann <i>Coulter™ Cytomics FC500</i>	Beckmann <i>Coulter™</i>
Glasflaschen (verschiedene Volumina)	Schott Duran
Glasplatten für Sterilin: 18 x 18 mm Deckgläser	Roth
Heizblock	HLC
ImmersoI™ 518F	Zeiss
<i>Infinite M200 Tecan</i>	Tecan
Injektionkanüle (26G1/2)	<i>BD Pharmingen™</i>
<i>IR Autoflow CO2 water-jacketed Incubator</i>	Nuaire™
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	IKA Labortechnik
<i>Microplates 96 Well ELISA, PS, U-Bottom</i>	Greiner <i>Bio-One</i>
Mikroskop CXX41	Olympus
Multifuge 3L-R (Eukaryonten)	Heraeus
Multifuge Avanti-J30I (Prokaryonten)	Beckman <i>Coulter™</i>
NanoDrop® ND-1000 <i>Spectrophotometer</i>	peQLab
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor
Nitrocellulose Transfer Membran <i>Whatman® PROTRAN®</i>	A. Hartenstein, <i>Whatman GmbH</i>
<i>Nunclon 96 Flat Bottom Polystyrol LumiNunc FluroNunc</i>	Nunc
Objektträger 76 x 26 x 1 mm (ISO 8037/1)	Paul Mariefeld
Pasteurpipetten	Hirschmann® Laborgeräte
<i>Phase Lock Gel Heavy 2 ml</i>	Prime
Photoentwicklermaschine Curix 60	AGFA
Photometer Bio PLUS	Eppendorf

<i>Pipetboy acu</i>	<i>IBS Integra Biosciences</i>
<i>PowerPac Basic™ Power Supply</i>	Bio Rad
Präzisionswaage ALJ120-4	Kern
<i>RoboCycler®</i>	<i>Stratagene</i>
Röntgenfilme: <i>CEA RP new Medical X-Ray screen film blue sensitive</i>	CEA GmbH
Schüttelinkubator Multitron Infor	SHT
SDS-PAGE Aparatur: <i>PROTEAN® II xi Cell</i>	Bio Rad
SDS-PAGE-Glasplatten: <i>Mini Protean® System Glass Plates</i>	Bio Rad
Sicherheitswerkbank Mobilien W90	<i>Variolab</i>
Sicherheitswerkbank Nuair	<i>Biological Safety Cabinets</i>
Sterilinplatten	<i>Sterilin Limited</i>
<i>Tecan infinite 200</i>	<i>BMG Lab Technologies</i>
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischschüttler 3015	GFL
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
Tisch-Kühlzentrifuge 541RD	Eppendorf
Ultrazentrifuge Optima™ TL	Optima
UVB-Röhren (TL2DW/12RS)	Philips
Vortex Mixer	A. Hartenstein
Waage <i>Precision Standard</i>	OHAUS
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge Avanti-J30I	Beckman Coulter™

2.1.6 Kits

<i>Cell Death Detection ELISA^{PLUS}</i>	Roche <i>Diagnostics</i>
<i>First strand cDNA synthesis Kit</i>	Fermentas
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche <i>Diagnostics</i>
<i>NE-PER[®]-Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit</i>	<i>Thermo Scientific, PIERCE Biotechnologie</i>
<i>NucleoBond[®] Xtra Midi Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>QIAquick[®] Gel Extraction Kit</i>	Qiagen GmbH
<i>QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene
<i>SuperSignal West DURA Extended Duration Substrate</i>	<i>Thermo Scientific</i>

2.1.7 Lösungen und Chemikalien

Agar Agar	Roth
Agarose für DNA-Elektrophorese	Roth
Ampicillin	Roth
Blocking Reagenz (Western Blot)	Roche <i>Diagnostics</i>
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bradford Roti [®] -Quant	Roche <i>Diagnostics</i>
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chlorophorm	Roth
<i>Complete[®] Protease-Inhibitor, EDTA-free</i>	Roche <i>Diagnostics</i>
<i>Desoxynucleoside Triphosphate Set</i> (Lösungen 100 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 4 x 10 µmol)	Roche <i>Diagnostics</i>
<i>Desoxyriboside Thymidine</i>	Sigma <i>Life Science</i>
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	<i>Calbiochem[®]</i>
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich

Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol, reinst.	VWR PROLABO®
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Glycerol	Roth
Glycin 99 %	Roth
Isophenylalkokol	Roth
Kaliumchlorid (KCl ₂)	Roth
Kanamycin	Roth
<i>Lipofectamine</i> ²⁰⁰⁰	Invitrogen
Manganchlorid (MnCl ₂)	Roth
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth
Mowiol	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Opti-MEM®	Gibco®
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin Streptomycin (Pen Strep)	Gibco®
Ponceau S	Roth
Roti-Phenol	Roth
2-Propanol (Isopropanol)	VWR
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Protein G- / Protein A- <i>Slurry</i>	KPL
Salzsäure 32 %	Merck

Sodium-Orthovanadate	<i>AppliChem</i>
Tetrazyklin	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin (Trypsin-EDTA 10x) (5 %)	Gibco® Invitrogen™
Tween 20	Roth

2.1.8 Medien

<i>Fetal Bovine Serum</i>	<i>HyClone® Thermo Scientific</i>
<i>Fetal Calf Serum</i>	<i>PromoCell</i>
LB-Agar, pH 7,0	1x LB-Medium, 1,4 % Agar Agar
LB-Medium, pH 7,0	10,0 g NaCl, 10,0 g Trypton, 5,0 g Hefeextrakt add. 1000,0 ml H ₂ O _{bidest.}
<i>Melanocyte Media M2</i>	<i>PromoCell</i>
RPMI-1640 + L-Medium	Gibco® Invitrogen™
Trypsin–EDTA (10x, 5 %)	Gibco® Invitrogen™

2.1.9 Inhibitoren, Stimulantien, Substrate

Caspase-Inhibitoren (zDEVD-FMK; C3), (zVEID-FMK; C6), (zIETD-FMK; C8), (zLEHD-FMK; C9)	<i>R&D Systems</i>
Caspase-3–Substrat: Ac-DEVD-AMC (ALX-260-031)	<i>Axxora</i>
Caspase-8–Substrat: Ac-IETD-AMC (ALX-260-042)	<i>Axxora</i>
Caspase-9–Substrat: Ac-LEHD-AMC (ALX-260-080)	<i>Axxora</i>
Cisplatin	<i>Platinex Bristol-Myers-Squibbs</i>
izTRAIL	Dr. Henning Walczak „Apoptosis Regulation“ German Cancer Research Center, Heidelberg
MG132	<i>Calbiochem®</i>

Pan-Caspase-Inhibitor (zVAD-FMK) *R&D Systems*

Q-Val-Asp(non-omethylated)-OPhMe
Inhibitor QVD *Imgenex*

2.1.10 Plasmide

pcDNA 3.1+	Invitrogen
pCR3.V62-Met-Flag	J. Tschopp, Lausanne
myc/Wt XIAP	myc/Wt XIAP-pcDNA3.1
myc/XIAP-D242E (Unspaltbar)	myc/XIAP-D242E-pcDNA3.1
myc/XIAP Δ 1-242	myc/XIAP Δ 1-242-pcDNA3.1
myc/Wt Caspase-8	myc/Wt Caspase-8-pcDNA3.1
Wt Caspase-8/myc	Wt Caspase-8/myc-pcDNA3.1
myc/Caspase-8 Prodomäne	myc/Caspase-8 Prodomäne-pcDNA3.1
myc/Caspase-8 Δ Prodomäne	myc/Caspase-8 Δ Prodomäne- pcDNA3.1
myc/Caspase-8 C360A (katalytisch inaktiv)	myc/Caspase-8 C360A-pcDNA3.1
myc/Caspase-8 (unspaltbar)	myc/Caspase-8-pcDNA3.1
Flag/Caspase-8 Wt	Flag/Caspase-8 Wt-pCR3.V62-Met- Flag
Caspase-8 Wt/Flag	Caspase-8 Wt/Flag-pCR3.V62-Met- Flag
myc/Bcl-2	myc/Bcl-2-pcDNA3.1
mito-pEGFP	<i>Clontech Mountain View</i>
NES/IETD/mCherry	I. Lavrik, Heidelberg
DsRed/Smac	<i>Clontech Mountain View</i>
DsRed/Smac Δ MTS	<i>Clontech Mountain View</i>

2.1.11 Primer

Tab. 2.2: Zur Amplifikation und Mutagenese mittels PCR verwendete Primer. Angegeben werden Primer-Name mit entsprechender Restriktionsschnittstelle (falls vorhanden) sowie die Sequenz. Die grau unterlegten Zeilen enthalten den Namen des ausgewählten Konstrukts (Vergleich schematische Darstellungen Abb. 2.2, Abb. 2.3, Abb. 2.4 in Absatz 2.2.21).

myc/XIAP-242E (unspaltbar)	
XIAP D242E <i>for</i>	5'-TCGAAGTGAATCTGAAGCTGTGAGTTCTGAT-3'
XIAP D242E <i>rev</i>	5'-ATCAGAACTCACAGCTTCAGATTCAGTTCTCGA-3'
myc/XIAP Δ1-242	
XIAP aa243 EcoRI <i>for</i>	5'-GCCGAATTCGCTGTGAGTTCTGATAGG-3'
XIAP-pcDNA3 XhoI <i>rev</i>	5'-CAGCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACAC-3'
Caspase-8 Wt/myc (tag N-terminal)	
hC8 BamHI <i>for</i>	5'-GCAGGATCCGACTTCAGCAGAAATC-3'
hC8 ApaI <i>rev</i>	5'-CCTGGGCCTCAATCAGAAGGGAAG-3'
myc/Caspase-8 Wt (tag C-terminal)	
hC8 BamHI <i>for</i>	5'-GCTGGATCCATGGACTTCAGCAGAAATC-3'
hC8 XbaI <i>rev</i>	5'-CGATCTAGAATCAGAAGGGAAGACAAG-3'
myc/Caspase-8 Prodomäne	
hC8 BamHI <i>for</i>	5'-GCTGGATCCATGGACTTCAGCAGAAATC-3'
hC8 prod. XbaI <i>rev</i>	5'-CGATCTAGAATCCTGTTCTCTTGGAGAGTCC-3'
myc/Caspase-8 ΔProdomäne	
hC8 dDED BamHI <i>for</i>	5'-GCTGGATCCATGAGTGAATCACAGAC-3'
hC8 XbaI <i>rev</i>	5'-CGATCTAGAATCAGAAGGGAAGACAAG-3'
myc/Caspase-8 D/E (unspaltbar)	
hC8 D216E <i>for</i>	5'-GACTCTCCAAGAGAACAGGAGAGTGAATCACAGACTTTG-3'
hC8 D216E <i>rev</i>	5'-CAAAGTCTGTGATTCAGTCTCCTGTTCTCTTGGAGAGTC-3'
hC8 D374E <i>for</i>	5'-GTATACCTGTTGAGACTGAGTCAGAGGAGCAACCC-3'
hC8 D374E <i>rev</i>	5'-GGGTTGCTCCTCTGACTCAGTCTCAACAGGTATAC-3'
hC8 D384E <i>for</i>	5'-CAACCCTATTTAGAAATGGAGTTATCATCACCTCAAACG-3'
hC8 D384E <i>rev</i>	5'-CGTTTGAGGTGATGATAACTCCATTTCTAAATAGGGTGG-3'
myc/Caspase-8 C360A (katalytisch inaktiv)	
hC8 C360A <i>inactive for</i>	5'-GTGTTTTTTTATTCAGGCTGCTCAGGGGGATAACTACCAG-3'
hC8 C360A <i>inactive rev</i>	5'-CTGGTAGTTATCCCCCTGAGCAGCCTGAATGGGAAACAC-3'

Flag/Wt Caspase-8 (tag N-terminal)	
hC8 Eco321 <i>for</i>	5'-GCTGATATCTCGACTTCAGCAGAAATCTT-3'
hC8 XbaI <i>rev</i>	5'-CGATCTAGATCAATCAGAAGGGAAGACAAG-3'
Wt Caspase-8/Flag (tag C-terminal)	
hC8 KpnI <i>for</i>	5'-GCTGGTACCATGGACTTCAGCAGAAATCTT-3'
hC8 BamHI <i>rev</i>	5'-CGAGGATCCAATCAGAAGGGAAGACAAG-3'
Flag/Caspase-8 Prodomäne	
hC8 prod. XbaI <i>rev</i>	5'-CGATCTAGAATCCTGTTCTTGGAGAGTCC-3'
hC8 Eco321 <i>for</i>	5'-GCTGATATCTCGACTTCAGCAGAAATCTT-3'

2.1.12 *small interfering RNA (siRNA)*

Tab. 2.3: Für den transienten *knock down* eingesetzte siRNA's. Angegeben werden siRNA-Name sowie -Sequenz.

siRNA-Name	Nukleotid-Sequenz
siCaspase-3	5'- UGAUCUUACACGUGAAGAATT -3'
siCaspase-6	5'- CGGCUCAUGGUACAUAUCAATT-3'
siCaspase-8	5'- GCAAUCUGUCCUCCUGAATT -3'
siCaspase-8 <i>smartpool</i> (<i>ON-TARGETplus</i> , <i>Thermo Scientific</i>)	5'- GGACAAAGUUUACCAAUG -3' 5'- GCCCAAACUUCACAGCAUU -3' 5'- GAUAAUCAACGACUAUGAA -3' 5'- GUCAUGCUCUAUCAGAUUU -3'
siCaspase-9	5'- GAAGAUUGUGAACAUCUUCTT -3'
siLacZ	5'- GCGGCUGCCGGAUUUACCTT -3'
siSmac/Diablo	5'- CCGCCAGGAAUCACAUUCA -3'
siXIAP	5'- AUCCAUCCAUGGCAGAUUATT -3'

2.1.13 Programme

Axio Vision Rel. 4.7.

Carl Zeiss Vision

Beckmann Coulter™ CXP

Beckmann Coulter™

Image Quant Application

Molecular Dynamics IQ Solutions

NanoDrop ND-1000 V3.1.0

NanoDrop Technologies

*pDRAW 32 DNA analysis software**AcaClone software***2.1.14 Puffer (allgemein)**Aktivitätspuffer
(Caspase-Aktivitäts-Assay), pH 7,4220 mM Mannose, 68 mM Saccharose,
10 mM HEPES, 5 mM NaPO₄, 2 mM
CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2,5 mM KH₂PO₄,
0,5 mM EGTA,
frisch: 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF

Azid-Wasser 0,03 %

1,0 ml Natriumazid (30 %) add. 1 L
H₂O_{bidest.}*Blocking-Solution* IF-Mikroskopie

5 % FCS in 1x PBS

Blocking-Solution (10 %) Western-Blot10 % (w/v) *Blocking Reagent* (Roche)
in Maleinsäurepuffer

Blotting Puffer, pH 8,3

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 %
Methanol

DEPC-Wasser

0,1 % Diethylpyrocarbonat über Nacht
gerührt, autoklaviert

DNA-Extraktionspuffer (Nicoletti), pH 7,8

0,2 M Na₂HPO₄, 0,004 % Triton X-100

DNA-Färbelösung (Nicoletti)

20 µg/ml PI, 200 µg/ml RNase A in
1x PBS

DNA Probenpuffer (6x)

1 mM EDTA, 50 % Glycerol, 0,025 %
Bromphenolblau, 0,025 % Xylencylöl

GIT-Puffer (Gesamt)

8 Teile Lsg. A + 1 Teil Lsg. B + 1 Teil
Lsg. C + 3 % β-ME

GIT-Puffer Lösung A

5 M GIT, autoklaviert

GIT-Puffer Lösung B, pH 4,5

3 M NaAc

GIT-Puffer Lösung C

10 % Laurylsacrosyl

Lämmli-puffer 2x, pH 6,8

125 mM Tris (pH 6,8), 4 % SDS, 10 %
Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau,
10 % β-Mercaptoethanol

Lämmli-puffer 5x, pH 6,8

312,05 mM Tris, 10 % SDS, 25 %
Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau

LB-Medium, pH 7,0

1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 %
NaCl

Maleinsäurepuffer, pH 7,5

100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl

PBS (10x)

26,7 mM KCl, 14,7 mM KH₂PO₄,
1379,3 mM NaCl, 80,5 mM Na₂HPO₄

PFA (4 %)	4 % PFA in 1x PBS
SDS-Laufpuffer, pH 8,3	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
SDS-Sammelgelpuffer, pH 6,8 (4x)	0,5 M Tris, 0,015 M SDS
SDS-Trenngelpuffer, pH 8,8 (4x)	1,5 M Tris, 0,015 M SDS
TAE-Puffer, pH 8,5 (10x)	0,4 M Tris, 0,01 M EDTA, 0,2 M Essigsäure
TBS-Puffer, pH 7,5 (10x)	5 M NaCl ₂ , 0,2 M Tris
TCM-Puffer (Transformation), pH 7,5	100 mM Tris, 100 mM NaCl ₂ , 100 mM MgCl ₂
TFB I-Puffer, pH 5,8	30 mM KAc, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM KCl, 1 M CaCl ₂ , 15 % Glycerol
TFB II-Puffer, pH 7,0	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15 % Glycerol
Tris/Glycin (5x)	125 mM Tris, 960 mM Glycin
Trypanblau-Lösung	0,4 % Trypanblau in H ₂ O
TTBS	1x TBS-Puffer, 0,05 % Tween 20
Zell-Lysepuffer (Caspase-Aktivitäts-Assay), pH 7,4	200 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 % IGEPAL, frisch: <i>Complete</i> [®]
Zell-Lysepuffer (IP-Puffer), pH 7,5	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin, 1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM (P ₂ O ₇) ⁴⁻ , 0,01 % NaN ₃ , frisch: <i>Complete</i> [®]
Zytosol-Lysepuffer (Mitochondrien / Zytosol Fraktionierung), pH 7,0	50 mM PIPES, 50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM EDTA, 10 µM Chytochalsin B, 220 mM Mannitol, 68 mM Sukrose, frisch: <i>Complete</i> [®]

2.1.15 Kometente Zellen (nach TFB-Methode)

E.coli Top10F' Invitrogen

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung primärer Melanozyten und Melanomzelllinien

A) primäre Melanozyten

Primäre humane Melanozyten wachsen adhärent in Zellkulturflaschen und weisen in Kultur bis Passage drei noch viele Eigenschaften und Marker auf, die sich auch *in vivo* in Melanozyten nachweisen lassen. Die Isolierung aus Vorhäuten von drei Patienten nach dem Protokoll von Edmondson (Edmondson et al., 1999) wurde freundlicherweise von Hanna Vörsmann durchgeführt. Die Kultivierung primärer Melanozyten erfolgte bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) im wasserdampf-gesättigten Begasungsschrank. In einem Intervall von max. vier Tagen wurde das Melanozyten-Medium (*Melanocyte Media M2*) erneuert, bzw. die Zellen passagiert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml 1x Trypsin für ca. 2-3 min im Brutschrank (37°C) inkubiert. Die Abstopfung der Trypsinspaltung erfolgte durch Zugabe von 2 ml unverdünntem FCS. Nach Pelletierung der Zellen für 10 min bei 1500 rpm wurden die primären Melanozyten in frischem Melanozyten-Medium resuspendiert und entweder in frische Zellkulturflaschen überführt, oder für Experimente entsprechend in Zellkulturschalen ausgesät (Tab. 2.4).

B) WM-3211 (RGP)

Die Melanom-Zelllinie WM-3211 wurde aus einem primären Melanom am Fußknöchel eines männlichen 74-jährigen Patienten kultiviert und repräsentiert die radiale Wachstumsphase. Melanomzellen wachsen ebenso wie primäre Melanozyten adhärent in Zellkulturflaschen aus und wurden analog im Zellinkubator bei 37°C, 5 % CO₂ in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von maximal 90 % wurden die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen und mit 4 ml 1x Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Abstopfung der Trypsinierung erfolgte durch Zugabe von 10 ml RPMI-1640 / 10 % FCS-Medium. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min pelletiert und nach Absaugen des ÜS in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und entsprechend zur weiteren Kultivierung zurück in Zellkulturflaschen bzw. in Zellkulturschalen für Experimente ausgesät (Tab. 2.4).

Dem Kultivierungsmedium wurde 5 % PenStrep zugesetzt, die Aussaat für Experimente erfolgte ohne den Zusatz von Antibiotika.

C) WM-115 (VGP)

Die Zelllinie WM-115 wurde aus Zellen eines primären Melanoms in der vertikalen Wachstumsphase einer 58-jährigen Frau kultiviert. Die Kultivierung erfolgte analog den Bedingungen beschrieben in **B)**.

D) WM-852 (MM)

Die Zelllinie WM-852 vertritt das metastatische Stadium eines Melanoms und wurde ebenfalls wie die anderen beschriebenen Melanomzelllinien (siehe **B)**) kultiviert.

2.2.2 Zellaussaat

Für eine Stimulation der Zellen mit verschiedenen Reagenzien sollte die Konfluenz in den Zellkulturschalen nicht höher als 80 % sein. Da sich die verschiedenen Zellen morphologisch unterscheiden, wurde für jede Zelllinie die optimale Zellzahl zur Aussaat in Zellkulturschalen bestimmt (siehe Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Ausgesäte Zellzahlen verwendeter Zelllinien zur Stimulation bzw. Transfektion.

Angegeben werden die Zellzahlen der verwendeten Zellen in Bezug auf die Fläche der verwendeten Zellkulturschalen, um eine optimale Konfluenz für die Stimulation bzw. Transfektion zu gewährleisten.

Kulturgefäß	Transfektion / Stimulation	WM-3211	WM-115	WM-852	Primäre Melanozyten
24-Well (1,9 cm ²)	<i>Lipofectamine</i> für DNA		0,12 x 10 ⁶		
	<i>Lipofectamine</i> für RNA		0,08 x 10 ⁶		
12-Well (3,9 cm ²)	<i>Lipofectamine</i> für DNA		0,17 x 10 ⁶		
	<i>Lipofectamine</i> für RNA		0,08 x 10 ⁶		
6-Well / 3,5-cm Schalen (9,6 cm ²)	<i>Lipofectamine</i> für DNA		0,45 x 10 ⁶		
	6 h Stimulation		0,31 x 10 ⁶		0,49 x 10 ⁶
	16 h Stimulation	0,35 x 10 ⁶	0,3 x 10 ⁶	0,25 x 10 ⁶	0,47 x 10 ⁶
10 cm- Schalen (58 cm ²)	6 h		2,8 x 10 ⁶		
	16 h		2,5 x 10 ⁶		

2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die geernteten Zellen (Ernte analog Vorgehen siehe 2.2.1 **B**) wurden gezählt und 2×10^6 Zellen jeweils in 1 ml FCS / 10 % DMSO resuspendiert und sofort in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden langsam mittels eines Isopropanolbefüllten Behälters, der ÜN bei -80°C gelagert wurde, eingefroren und am nächsten Tag entweder bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Eingefrorene Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, vorsichtig in vorgewärmtes RPMI-1640 / 10 % FCS überführt und sofort bei 1500 rpm für 5 min pelletiert. Nach Entfernung des ÜS wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel sowie die Zugabe von 5 % PenStrep.

2.2.4 Vitalbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt. Dieser anionische Diazofarbstoff ist nicht membranpermeabel und färbt somit nur tote Zellen ohne intakte Zellmembran an. Für die Lebendzellzahlbestimmung wurde ein Aliquot Zellsuspension mit Trypanblaulösung 1:1 versetzt und 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop können anhand der Blaufärbung tote von lebenden Zellen unterschieden und ausgezählt werden.

2.2.5 Stimulation der Zellen

Die UVB-Bestrahlung erfolgte mit Hilfe einer Kammer, die mit sechs UVB-Röhren mit einer Gesamtleistung von $0,97 \text{ mJ/cm}^2$ mit einem Emissionspeak von 313 nm ausgestattet ist. Für die Bestrahlung wurde das Kulturmedium abgenommen und durch ein halbes Kulturvolumen 1x PBS ersetzt. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die UVB-Behandlung mit einer sublethalen Dosis von 20 mJ/cm^2 . Anschließend wurde das abgenommene Kulturmedium wieder auf die Zellen gegeben. Cisplatin wurde direkt mit einer Endkonzentration von 10 bzw. 20 μM ins Kulturmedium gegeben. Für die Stimulation des TRAIL-Todesrezeptors wurde das aktive trimere Isoleuzin-Zipper-TRAIL (izTRAIL) (Ganten et al., 2006) mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml bzw. 500 ng/ml eingesetzt. Im Falle von eingesetzten Inhibitoren wurden 30 min vor Stimulation die entsprechenden

Inhibitoren (20 μ M zVAD, 5 μ M QVD, 10 μ M DEVD, 10 μ M IETD, 10 μ M LEHD, 20 μ M MG132; siehe auch Tab. 2.1.9) zugegeben und, falls die Zellen zusätzlich UVB-bestrahlt wurden, anschließend mit dem zuvor abgenommenen Kulturmedium versetzt.

2.2.6 Cell Death Detection ELISA

Zur Ermittlung der Apoptoserate einer Zellpopulation wurde der *Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Kit* eingesetzt. Ein Charakteristikum der Apoptose ist die proteolytische Fragmentierung des Chromatins in nukleosomale Fragmente definierter Größe. Dabei verbleiben die Histone an den DNA-Fragmenten assoziiert (Mono- und Oligonukleosomen). Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen geerntet und mittels Trypanblauanfärbung die Lebendzellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils 5000 Zellen in den Assay eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Das Prinzip des Tests beruht auf spezifischer Bestimmung im Zytosol angereicherter Mono- und Oligonukleosomen als Maß der Apoptoserate. Von jeder Probe wurden jeweils Doppelwerte bestimmt. Der *enrichment factor* errechnet sich durch Ermittlung der Absorption von stimulierten Zellen geteilt durch die Absorption von unstimulierten Kontrollzellen. Ein *enrichment factor* von 2 korreliert für die verwendeten Zelllinien mit einer Apoptoserate von 10 %, wie zuvor durch AnnexinV-Messung im FACS bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

2.2.7 Caspase-Aktivitäts-Assay

Für die Messung der Caspase-Aktivität wurden die Zellen nach dem Ernten mit 1 ml 1x PBS gewaschen und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min und dem Entfernen des ÜS wurde das Pellet in Caspase-Lysepuffer resuspendiert. Das Volumen des eingesetzten Lyse-Puffers orientierte sich an der Größe des Zellpellets. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation (13000 rpm, 10 min bei 4°C). Der ÜS wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (2.2.11) bestimmt, so dass exakt 15 μ g Protein pro Ansatz in den Aktivitäts-Assay eingesetzt werden konnten. Alternativ kann das Zelllysate bei -80°C für eine spätere Messung eingefroren werden. Die Messung erfolgte in einer schwarzen Mikrotiterplatte nach Zugabe von 50 μ l

Aktivitätspuffer sowie 75 µl Substratlösung (40 µM Caspase-Substrat in Aktivitätspuffer) im *Tecan Reader*. Als Referenz diente frischer Lysepuffer ohne Zellprotein in Aktivitätspuffer. Die Messung erfolgte mit einer Extinktion von 380 nm (Bandbreite 9 nm) und einer Emission von 460 nm (Bandbreite 20 nm) bei einer Integrationszeit von 20 µs über 2 h bei einem Intervall von 15 min. Die n-fache Caspase-Aktivität wurde durch Bildung des Quotienten der Messwerte von stimulierten und unstimulierten Zellen errechnet.

2.2.8 Co-Immunopräzipitation

Nach der Ernte wurden die Zellen in gekühlte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Entsprechend des Zellpelletvolumens wurde IP-Lysepuffer zugegeben, der kurz zuvor mit Protease-Inhibitoren versetzt wurde (1x *Complete*[®], 0,5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄). Die Lyse erfolgte für 15 min auf Eis. Nach Abtrennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min (4°C), erfolgte die Proteinbestimmung der löslichen Proteine im ÜS nach der Bradford-Methode (2.2.11). Entsprechend des Isotyps des für die IP eingesetzten AK's wurde entweder Protein G-Sepharose (AK in *mouse* produziert) oder Protein A-Sepharose (AK in *rabbit* produziert) eingesetzt. Die Protein-Sepharose wurde in IP-Lysepuffer äquilibriert (1 h bei 4°C rollern) sowie die Proteinüberstände vor der IP mit Protein-Sepharose für 1 h bei 4°C ohne AK inkubiert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. In die IP wurden 1000 µg Gesamtprotein in 1 ml Lysepuffer und je nach Angaben des Herstellers 3–5 µg AK eingesetzt. Als Kontrolle diente jeweils ein IP-Ansatz mit einem AK des entsprechend eingesetzten Isotyps, der gegen ein unspezifisches Protein gerichtet ist. Die Proteinlysate wurden für 2 h bei 4°C mit den entsprechenden AK inkubiert. Es folgte die Zugabe der äquilibrierten Protein-Sepharose und eine weitere Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde das Präzipitat dreimal mit 600 µl IP-Lysepuffer gewaschen (max. 10 s bei 13000 rpm) wobei der ÜS mit einer ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig und möglichst vollständig entfernen wurde. Die Protein-Sepharose wurde mit 2x Lämmli-puffer (+ 3 % β-ME) bei 95°C für 10 min inkubiert, anschließend für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der ÜS mittels einer SDS-PAGE analysiert.

2.2.9 Mitochondrien-Zytosol Fraktionierung

Um die Mitochondrien vom Zytosol abzutrennen wurden die Melanomzellen nach Aussaat und Stimulation geerntet und 1 x in kaltem 1x PBS gewaschen. Das Pellet wurde entsprechend seiner Größe in einem adäquaten Volumen Zytosol-Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis mit anschließender 10-maliger Passagierung durch eine Injektionskanüle (26G1/2). Nach Zentrifugation bei 800 rpm für 10 min (4°C) wurde der ÜS in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der ÜS wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Gehalt zytosolischer Proteine mittels Bradford-Methode bestimmt (2.2.11). Die pelletierten Mitochondrien wurden direkt in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 10 min im Heizblock bei 95°C denaturiert.

2.2.10 Zytoplasma-Nukleus-Fraktionierung

Die Separierung der Nuklei vom Zytoplasma erfolgte mittels *NE-PER[®]-Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit* der Firma *Thermo Scientific, Pierce Biotechnology*. Dabei wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (Pierce Biotechnology, 2003). Für die Lokalisationsanalyse von Caspase-8 unter verschiedenen Bedingungen in WM-115-Zellen wurde jeweils ein gesamter Elektroporationsansatz ($6,5 \times 10^6$ Zellen) nach 24-stündiger Überexpression der entsprechenden Varianten in die Fraktionierung eingesetzt.

2.2.11 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Bestimmung ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Das Prinzip beruht auf einem Farbumschlag des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue G-250 durch Komplexbildung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen, wodurch sich sein Absorptionsspektrum von 470 nm zu 595 nm verschiebt. Diese Verschiebung kann nach Erstellen einer Standardreihe durch eine definierte BSA-Proteinkonzentration (50 mg/ml) in verschiedenen Verdünnungen, mit Hilfe des *ELISA-Readers* gemessen und entsprechend ausgewertet werden.

2.2.12 Herstellung und Aufbereitung von Proteinextrakten

Nach entsprechender Inkubationszeit mit verschiedenen Stimuli wurden die Zellen mit ÜS geerntet, durch Zugabe von IP-Lysepuffer für 30 min auf Eis lysiert und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Proteingehalt im ÜS wurde nach der Bradford-Methode photometrisch bestimmt und das Zelllysat mit einem identischen Volumen 2x Lämmli-puffer versetzt. Alternativ wurden die Zellen ohne ÜS durch direkte Zugabe 95°C-heissen 2x Lämmli-puffers in den Zellkulturschalen lysiert. Nach Überführung in *Safe-lock* Eppendorf-Gefäße wurden die Proteinextrakte für 10 min bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert. Nach kurzem Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm wurde das Proteinlysat entweder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20°C zur späteren Verwendung eingefroren.

2.2.13 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacryl-Amid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) gehört zu den Standard-Methoden der Molekularbiologie und dient der Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe. Entsprechend der vorgegebenen Proteingrößen wurden unterschiedlich konzentrierte Trenngele eingesetzt (10 % - 15 %). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V.

2.2.14 Proteintransfer durch die Semi-dry Western-Blot-Methode

Für die anschließende Analyse wurden die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Dazu wurden drei mit Blotting-Puffer getränkte *Whatman*-Filter übereinander geschichtet, anschließend folgten das Proteingel, die Nitrozellulosemembran und schließlich wieder drei befeuchtete *Whatman*-Filter. Unter einer konstanten Stromstärke von 70 mA pro Blot für 1,5 h wandern die aufgetrennten Proteine zur Anode und werden so auf die Membran transferiert. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Membranen mit dem unspezifischen Proteinfarbstoff Ponceau S angefärbt.

2.2.15 Immundetektion

Nach dem Transfer wurden die Membranen abhängig von den für die Detektion eingesetzten AK's entweder in 1 % *Blocking-Solution* (Roche) oder 5 % BSA / 0,1 % Tween 20 für mindestens 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation der Membran mit den primären AK's erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers ebenfalls entweder in 0,5 % *Blocking-Solution* oder 5 % *non-fat-dry milk* / 0,1 % Tween 20 mit einer 1:1000-Verdünnung bei 4°C ÜN. Entsprechend wurden die sekundären Isotypspezifischen AK's nach Angaben des Herstellers mit einer Verdünnung 1:3333 eingesetzt. Da die eingesetzten Sekundärantikörper Peroxidase-konjugiert sind, erfolgte die Detektion mit Hilfe von *SuperSignal West DURA Extended Duration Substrate* (DURA) oder durch Zugabe der selbsthergestellten H₂O₂-haltigen ECL-Substratlösung nach Exposition von Röntgenfilmen in der Dunkelkammer.

2.2.16 Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti

Für die Untersuchung des Zellzyklus wurde die Färbemethode nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) angewendet und im Durchflußzytometer analysiert. Die Zellen wurden nach erfolgter Stimulation bzw. Transfektion geerntet, einmal in 1x PBS gewaschen und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Pelletierung wurden die Zellen in 500 µl 1x PBS aufgenommen und mit 4,5 ml eiskaltem 70 %-igem EtOH für 15 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2600 rpm für 5 min abzentrifugiert und der ÜS entfernt. Das Pellet wurde in 5 ml 1x PBS gewaschen, erneut bei 2600 rpm für 5 min zentrifugiert und der ÜS verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl 1x PBS resuspendiert und mit 500 µl DNA-Extraktionspuffer versetzt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei RT mit anschließender Pelletierung bei 2600 rpm für 5 min. Der ÜS wurde entfernt, das Pellet in 1 ml DNA-Färbelösung aufgenommen und für 1-24 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Während dieser Inkubationszeit verändert sich das DNA-Profil nicht und kann somit entsprechend der experimentellen Zeitoptimierung variiert werden. Die präparierten Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflußzytometer analysiert. Da jede Zellzyklusphase einen korrelierenden DNA-Gehalt im Verhältnis zur Zellgröße aufweist, kann so Rückschluss auf die Verteilung einer Zellpopulation über distinkte Zellzyklusphasen gezogen werden.

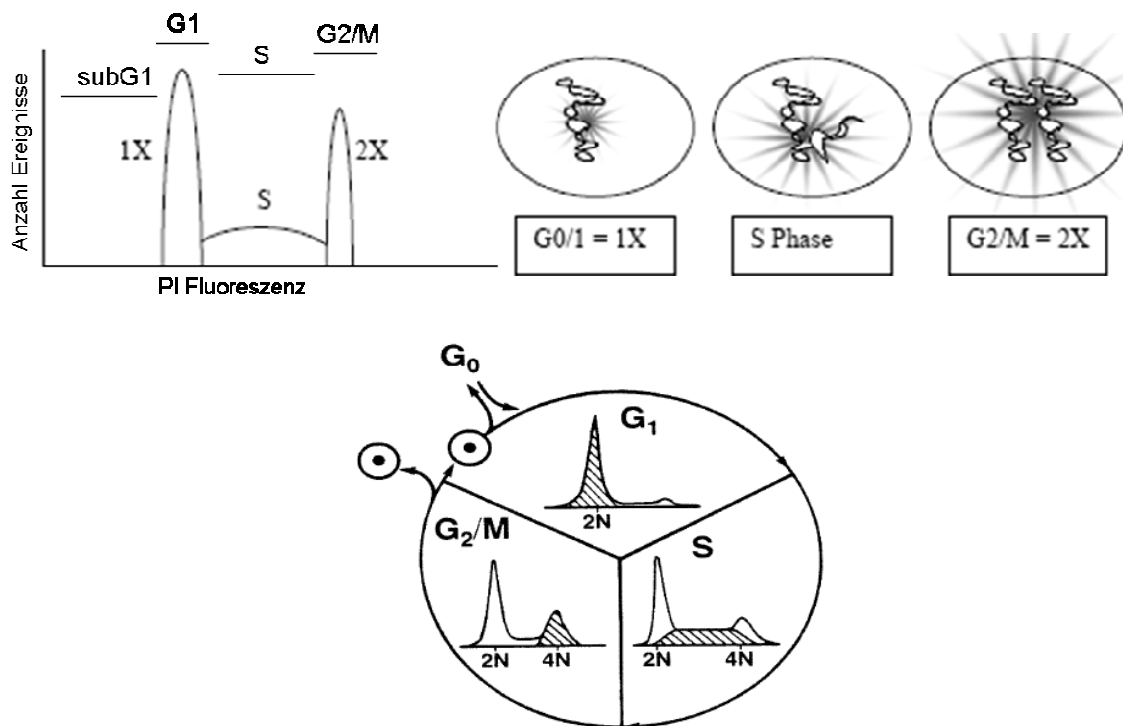


Abb. 2.1: Das Prinzip der Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti. Jede Zellzyklusphase weist einen spezifischen DNA-Gehalt auf und lässt in Relation zur Zellzahl Rückschluss auf die Phasen-Verteilung einer Zellpopulation zu (modifiziert nach Rabinovitch, 2002).

2.2.17 Doppel-Thymidinblock / S-Phase-Arrest

Für die Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase wurde Desoxyribosid-Thymidin eingesetzt. Die Zellen wurden mit einem Überschuss (2 mM) dieses Pyrimidin-Desoxynukleosids für 19 h kultiviert. Durch das im Übermaß vorhandene Desoxy-Thymidin kommt die DNA-Replikation zum Erliegen, da im Verhältnis zu wenig der übrigen Desoxy-Nukleotide zur Verfügung stehen. Der Zellzyklus wird in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) arretiert. Für eine optimierte Synchronisation wurde der Arrest zunächst für 8 h durch dreimaliges Auswaschen des Thymidins mit 1640-RPMI-Medium ohne FCS unterbrochen. Dadurch wurde gewährleistet, dass auch Zellen, die in der ersten Synchronisationsrunde ganz zu Beginn der S-Phase blockiert wurden, diese Phase beenden. Es folgte ein zweiter Arrest durch Zugabe des Desoxyribosid-Thymidins in das Kulturmedium für 16 h. Durch diese Technik können ca. 80 % der Zellpopulation am Anfang der S-Phase synchronisiert werden. Entsprechend der experimentellen Fragestellung wurden die Zellen anschließend entweder sofort untersucht, oder durch wiederholtes Auswaschen mit Medium ohne

FCS aus dem Arrest entlassen und nach definierten Zeiträumen (abhängig von der zu analysierten Zellzyklusphase) im Durchflußzytometer analysiert.

2.2.18 Antikörperfärbung für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für die IF-Mikroskopie wurden Zellen auf Deckgläschen in Sterilinplatten ausgesät. Die Zellzahl richtete sich hierbei nach der Versuchsmethode. Für eine siRNA-Transfektion wurden 80.000 WM-115-Zellen in 1 ml RPMI / 10 % FCS, für die DNA-Transfektion hingegen 170.000 WM-115-Zellen ausgesät. Nach erfolgter Stimulation bzw. Inkubation wurde der ÜS aus den Sterilinplatten abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4 % PFA für 20 min bei RT. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen für 5 min mit 1 M Glycin inkubiert und wiederum mit 1x PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit *Blocking-Solution* (1x PBS / 5 % FCS) für 30 min bei RT. Die Inkubation mit dem Primär-AK erfolgte in einer Verdünnung entsprechend den Angaben des Herstellers in *Blocking-Solution* (siehe Tab.2.5) für 2 h bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurde der Sekundär-AK (Verdünnungen siehe Tab. 2.5) auf die Zellen gegeben und diese für 1,5 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit 1x PBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Dafür wurde 1 µg DAPI in 1 ml 1x PBS gelöst und für 20 min im Dunkeln (RT) auf die Zellen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Glasplättchen aus den Sterilinplatten genommen und mit Hilfe eines Tropfens Mowiol auf Objektträger eingedeckt. Nach Aushärten der Mowiollösung erfolgte die Mikroskopie mit einem 64x-Objektiv unter Öl am *Cell Observer*. Dabei wurde jeweils eine Bildserie unterschiedlicher Ebenen durch die Zellen aufgenommen (*z-stack*), so dass später mit Hilfe der *Axio Vision Rel. 4.7. software* die Kernebene exakt ermittelt werden konnte. Die im Ergebnissteil dargestellten Abbildungen präsentieren jeweils ein Einzelbild der Kernebene.

Tab. 2.5: Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzte AK. Es werden die für die IF-Mikroskopie eingesetzten AK sowie deren verwendete Verdünnung angegeben. Zudem wird angegeben, ob der entsprechende AK als Primär- oder Sekundär-AK eingesetzt wurde.

AK	Eingesetzte AK	Verdünnung
Sekundär-AK	anti- <i>mouse</i> Alexa Fluor® 546 # A21143	1 : 1000
Sekundär-AK	anti- <i>rabbit</i> Alexa Fluor® 488 # A11094	1 : 1000
Primär-AK	anti-Caspase-8 mAb (C15), <i>mouse</i> Hybridoma ÜS (HD)	1 : 5
Primär-AK	anti-FADD # 610399, <i>mouse</i>	1 : 750
Sekundär-AK	anti-IgG-FITC # F9137, <i>mouse</i>	1 : 200
Primär-AK	anti-FLAG M5 # F4042, <i>mouse</i>	1 : 4000
Primär-AK	ant-c-myc clone 9E10 # MA1-980, <i>mouse</i>	1 : 250
Primär-AK	anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (29E3) # 9718, <i>rabbit</i>	1 : 400
Primär-AK	anti-Phospho-Histone H3 [pSer10] # H0412, <i>rabbit</i>	1 : 1000

2.2.19 RNA-Isolierung

WM-115-Melanomzellen, welche am Tag zuvor in 10 cm-Kulturschalen ausgesät wurden, wurden nach der Ernte (wie in 2.2.1 **B**) beschrieben) in 500 µl GIT-Puffer resuspendiert. Nach gründlichem Mischen wurde die Zellsuspension in ein 2 ml *Phase Lock*-Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 40 µl NaAc (100 %), 400 µl Phenol sowie 120 µl CIAA (49:1). Nach erneutem kräftigen Durchmischen wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der ÜS wurde in ein frisches *Phase Lock*-Gefäß überführt, 200 µl Phenol sowie 200 µl CIAA zugegeben und kräftig gemischt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13000 rpm für 5 min (4°C) wurde der ÜS wiederum in ein frisches *Phase Lock*-Gefäß überführt und 1:1 mit einem identischen Volumen CIAA versetzt. Wieder wurde sehr kräftig gemischt und zentrifugiert. Der ÜS wurde in ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol (100 %, RT) gemischt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (4°C) wurde der ÜS entfernt und das RNA-Pellet 1 mal mit eiskaltem 70 %-igen EtOH gewaschen. Der ÜS wurde abermals verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und anschließend in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte

mit Hilfe des NanoDrop®ND-1000 *Spectrophotometer*. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -70°C.

2.2.20 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *First strand cDNA synthesis Kit* der Firma Fermentas gemäß dem Protokoll des Herstellers. Alle Schritte wurden mit Filtertip-Pipettenspitzen, Handschuhen, sowie RNase-freien Reaktionsgefäßen durchgeführt. Als *Template* diente aus WM-115-Melanomzellen isolierte RNA.

2.2.21 Klonierung

Für die Klonierung unterschiedlicher XIAP- und Caspase-8-Varianten dienten die zuvor hergestellten cDNA's als *Template*. Für die Amplifikation der XIAP- bzw. Caspase-8-Sequenz wurden die in Tab. 2.2 angegebenen Primer in die PCR eingesetzt.

A) XIAP myc-getaggt

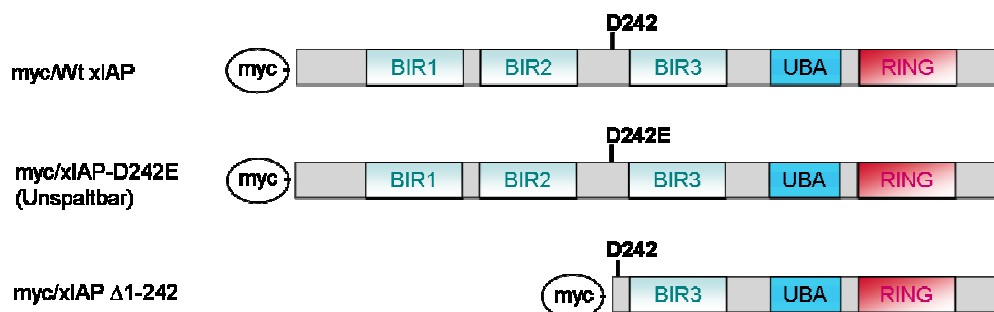


Abb. 2.2: Schematische Darstellung klonierter XIAP-Konstrukte für die Untersuchung der UVB-vermittelten Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose. Gezeigt werden die XIAP-Varianten mit entsprechenden Domänen, sowie das in der Mutagenese mutierte Aspartat (D) innerhalb der Caspase-Spaltstelle. Die Lokalisation des fusionierten tags wird ebenfalls angezeigt.

B) Caspase-8 myc-getaggt

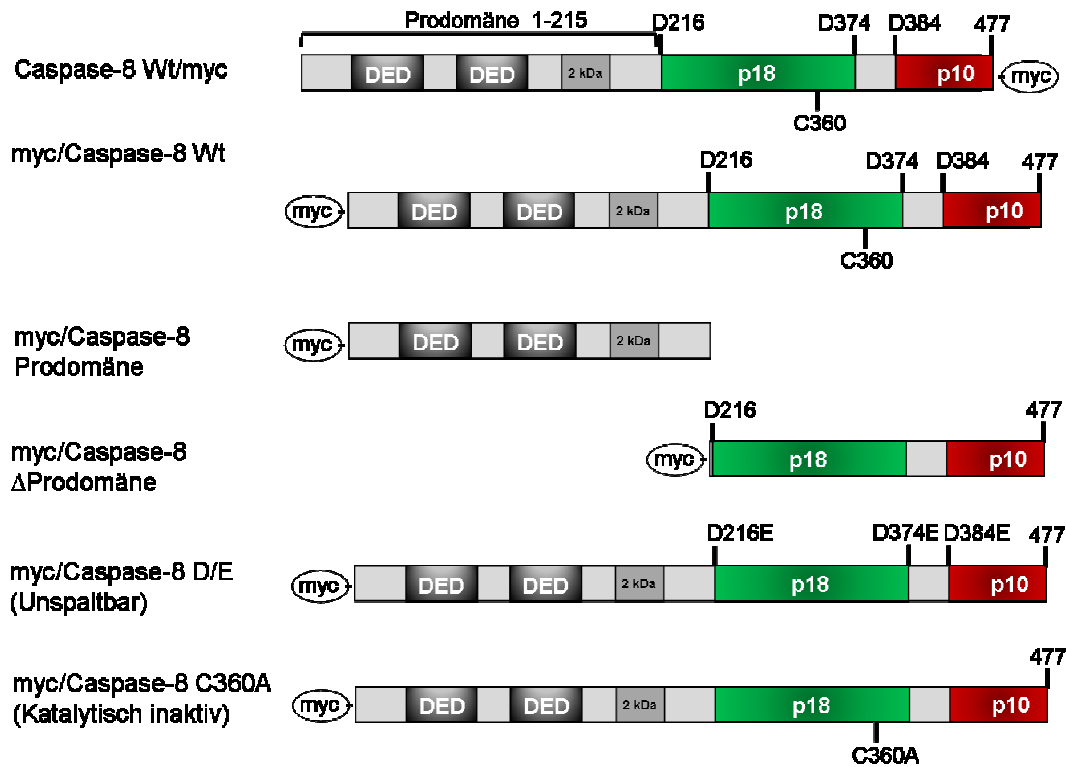


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der für die Untersuchung alternativer Caspase-8-Funktionen in humanen Melanomzellen klonierter Caspase-8-Varianten mit myc-tag. Dargestellt werden die angegebenen Caspase-8-Varianten mit entsprechenden Domänen sowie ihre Prozessierungsstellen. Zudem werden die Mutagenese-Stellen in den funktionalen Mutanten (myc/Caspase-8 D/E und myc/Caspase-8 C360A) angezeigt. Ebenso wird die Lokalisation des fusionierten tags angegeben.

C) Caspase-8 Flag-getaggt

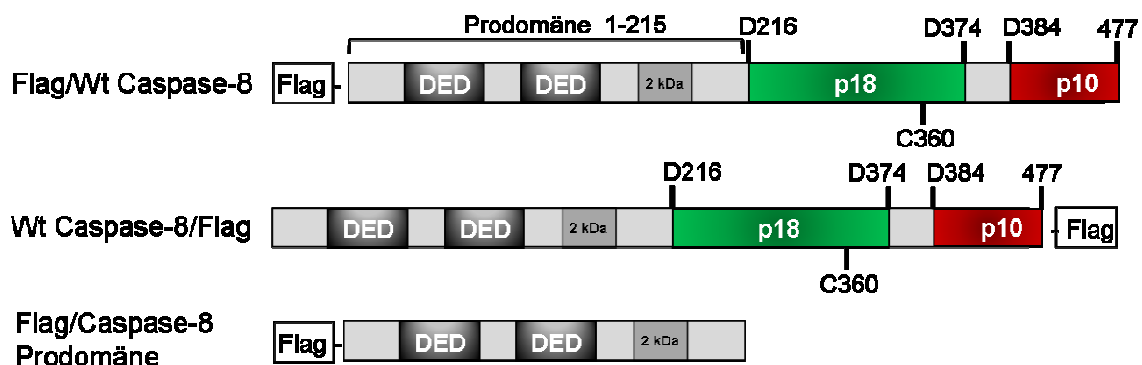


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der für die Untersuchung alternativer Caspase-8-Funktionen in humanen Melanomzellen klonierter Caspase-8-Varianten mit Flag-tag. Dargestellt werden die angegebenen Caspase-8-Varianten mit entsprechenden Domänen sowie ihre Prozessierungsstellen. Die Position des fusionierten tags wird ebenfalls angegeben.

2.2.22 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifikation verschiedener XIAP- und Caspase-8-Konstrukte wurde mit dem *Expand High Fidelity Plus PCR System* der Firma Roche *Diagnostics* gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die *Annealing*- und *Elongations*-temperaturen wurden entsprechend den Primer-Eigenschaften modifiziert. Die erfolgreiche Vervielfältigung der gewünschten Gensequenzen wurde nach Aufreinigung über *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche *Diagnostics*) auf DNA-Agarosegelen kontrolliert.

2.2.23 Mutagenese

Für die Mutagenese verschiedener Konstrukte wurde der *QuickChange Site-directed Mutagenese Kit* von *Stratagene* eingesetzt. Die Primer hierfür wurden manuell erstellt und durch die Firma MWG synthetisiert. Es wurden zwei komplementäre 33 Basen-lange Oligonukleotid-Stränge konstruiert, in welche die Mutation mittig eingebracht wurde und die einem optimalen GC-Gehalt von ca. 40 % aufwiesen. Die Mutagenese-Primer sind in Tab. 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.6: Zusammensetzung des Mutagenese-Ansatzes zur Einführung von Mutationen. Angegeben werden die eingesetzten Substanzen, deren Volumina sowie die finale Konzentration.

Substanz	Volumen [μ l]	Konzentration
10x <i>QuikChange</i> [®] <i>Site-directed reaction Buffer</i>	5,0	1x
ds <i>Template</i> -DNA	1,0	100 ng
Mutagenese-Primer, jeweils	1,5	10 μ M
dNTP Mix	5,0	0,2 mM
MgSO ₄	3,0	2,5 mM
<i>KOD Hot Start DNA Polymerase</i>	1,0	1 Unit
steriles bidest. Wasser	32,0	-
Gesamtansatz	25,0	

Tab. 2.7: Verwendetes Temperaturprogramm bei der Mutagenese nach *Stratagene*. Angegeben werden die Nummer, der Vorgang, die Temperatur und die Dauer des jeweiligen Schritts.

Schritt Nr.	Vorgang	Zyklen	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
1	Initiale Denaturierung	1	95	2 min
2	Denaturierung	Je nach Mutation *)	95	30 sek
3	<i>Annealing</i>		55	1 min
4	Elongation		68	2 min / 1 Kb Plasmidlänge

*) Punktmutationen: 12 Zyklen
 Single AS-Austausche: 16 Zyklen
 Multiple AS-Insertionen / Deletionen: 18 Zyklen

Der PCR-Ansatz wurde anschließend über ein Säulchen (*High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche *Diagnostics*) aufgereinigt und mit DpnI für 2 h bei 37°C verdaut, um die *Template*-DNA zu eliminieren. Nach erneuter Aufreinigung des Ansatzes erfolgte die Transformation in *E.coli*-Bakterien (siehe 2.2.26).

Die Analyse der Mutagenese erfolgte nach einer Plasmid-Minipräparation (siehe 2.2.27) mittels Sequenzierung durch die Firma GATC.

2.2.24 Restriktionsverdau und Ligation in Expressionsvektoren

Entsprechend der konstruierten Primer wurden die PCR-Produkte, ebenso wie die Akzeptor-Vektoren mit entsprechenden Restriktionsenzymen gemäß den Angaben des Herstellers (Fermentas) verdaut und anschließend entsprechend den Vorschriften mit T4 DNA Ligase (Roche *Diagnostics*) ligiert.

2.2.25 Herstellung Calcium-kompetenter Bakterien nach TFB-Methode

10 ml LB-Medium (+ 10 µg/ml Tetrazyklin zur Selektion) wurden am Vortag mit *E.coli Top10F'* beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine 100 ml-Kultur mit dieser ÜN-Kultur inokuliert und bis zu einer OD von 0,3 bei einer Wellenlänge von 550 nm kultiviert. Ab diesem Schritt erfolgten alle Arbeitsschritte gekühlt bei max. 4°C. Die Bakterienkultur wurde bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert und der ÜS entfernt. Das Pellet wurde in 10 ml TFB I-Puffer durch Schwenken resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 rpm, 10 min) wurde der ÜS verworfen und das Pellet in 4 ml TFB II-Puffer durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Die Zellen wurden zügig aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80°C eingelagert wurden.

2.2.26 Transformation in Bakterien

10 µl der aufgereinigten Ansätze aus der Mutagenese-PCR bzw. nach Ligation in entsprechende Vektoren wurden mit 15 µl H₂O_{bidest.} verdünnt und mit 50 µl TCM-Puffer versetzt. Dem Gemisch wurden 125 µl Ca-kompetente *Top10F'*-Bakterien (2.2.25) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für exakt 2 min. Nach 1 min Abkühlung auf Eis wurde den Bakterien 800 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C in einem

Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und ÜN im Bakterien-Inkubator inkubiert.

2.2.27 Plasmid-Minipräparation

Für die Plasmid-Minipräparation wurden die Puffer des *NucleoBond[®] Xtra Midi Kit* (Macherey-Nagel) verwendet. 1 ml ÜN-Kultur mit entsprechend zugesetztem Antibiotikum zur Selektion wurde am Vortag mit einer Bakterienkolonie inokuliert und bei 37°C auf dem Schütter inkubiert. Die Ernte der Bakterienzellen erfolgte in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 2500 rpm für 5 min. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen, 100 µl Lysepuffer zugegeben und die Eppendorf-Reaktionsgefäße 5 mal invertiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 100 µl Neutralisierungspuffer zugegeben und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der ÜS wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 660 µl eiskaltem EtOH (100 %) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm (4°C) wurde der ÜS verworfen und das DNA-Pellet für etwa 5 min Luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl sterilem H₂O_{bidest.} aufgenommen und entweder durch eine Kontroll-Restriktionsanalyse charakterisiert, oder zur Sequenzierung durch die Firma GATC geschickt.

2.2.28 Elektroporation

Für die ektopische Expression von Proteinen wurden Expressionsvektoren in die verschiedenen Zelllinien transfiziert. Für große Zellzahlen wurde hierfür die Elektroporationsmethode eingesetzt. Die Zellen wurden am Vortag in große Zellkulturflaschen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60 % aufwiesen. Alle Schritte der Transfektion erfolgten gekühlt bei 4°C oder auf Eis. Die Zellen wurden geerntet, in eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 10 ml 1x PBS resuspendiert. $6,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 600 µl RPMI / 10 % FCS resuspendiert und in gekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Je nach Zelllinie wurden 1,5 – 2,5 % DMSO sowie 25 µg Plasmid-DNA zugegeben. Die Ansätze wurden in gekühlte 4 mm-Elektroporations-Küvetten überführt und mit Hilfe des *Easyject Plus* elektroporiert. Das verwendete Programm mit den entsprechenden Parametern richtete sich hierbei nach der eingesetzten Zelllinie und wurde zuvor experimentell

ermittelt. Für jede der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (WM-3211, WM-115, WM-852) wurde eine DMSO-Konzentration von 1,5 % eingesetzt sowie eine Spannung von 250 V bei einem unendlichen Widerstand und 1200 μ F angelegt. Die Elektroporationsansätze wurden anschließend sofort in 20 ml vorgewärmtes RPMI-1640 / 10 % FCS überführt und entsprechend der weiteren Versuchsplanung in Zellkulturschalen ausgesät. Für die ausgesäten Zellzahlen im Bezug auf die Kulturbedingungen sowie dem experimentellen Aufbau (siehe Tab. 2.4).

2.2.29 *Lipofectamine*²⁰⁰⁰-Transfektion

Die *Lipofectamine*-Transfektion beruht auf dem Prinzip einer kationischen Liposomen-Vermittelten Transfektion und wurde für kleinere Versuchs-Ansätze verwendet. Hierfür kam das kommerziell erhältliche *Lipofectamine*²⁰⁰⁰-Reagenz der Firma Invitrogen zum Einsatz.

A) DNA-Transfektion

Für eine DNA-Transfektion wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau in unterschiedlich große Zellkulturschalen oder Zellkultur-Platten mit 80–90 % Konfluenz ausgesät. Je nach Größe des Ansatzes wurden die Volumina des eingesetzten *Lipofectamine*²⁰⁰⁰-Reagenz und die eingesetzte DNA-Menge entsprechend den Angaben des Herstellers variiert. Für die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien (WM-3211, WM-115 und WM-852) wurden 2 μ g DNA sowie 3 μ l *Lipofectamine*²⁰⁰⁰ in jeweils 100 μ l OptiMEM[®] für die Transfektion in 12-Well-Platten eingesetzt. Für größere Ansätze wurden die eingesetzten Reagenzien entsprechend diesem Verhältnis angepasst. Für die Überexpressions-Studien wurden die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert.

B) siRNA-Transfektion

Analog wurde auch siRNA mittels *Lipofectamine*²⁰⁰⁰-Reagenz transfiziert. Jedoch wurden die Zellen hierfür mit einer Konfluenz von 30–50 % ausgesät und Filtertip-Pipettenspitzen sowie RNase-freie Materialien verwendet. Für die Melanom-Zelllinien wurde 20 pmol siRNA und 2 μ l des *Lipofectamine*²⁰⁰⁰-Reagenz (in jeweils 100 μ l OptiMEM[®]) eingesetzt. Primäre Melanozyten hingegen wurden mit 20 pmol siRNA und 3 μ l *Lipofectamine*²⁰⁰⁰ in jeweils 100 μ l OptiMEM[®] transfiziert. Die Analyse des

knock downs erfolgte je nach verwendeter siRNA nach 48 h bzw. 72 h Inkubation bei 37°C.

3 Ergebnisse

3.1 Caspase-3 spaltet XIAP in einem regulatorischen *feedback-loop* zur synergistischen Induktion von Apoptose

3.1.1 Die Sensitivierung TRAIL-resistenter Melanomzellen durch Bestrahlung mit sublethalen UVB-Dosen

Der Todesligand TRAIL gilt als potentes tumorselektives Therapeutikum der modernen Krebstherapie (Newsom-Davis et al., 2009). Es konnte jedoch mittels *Cell Death Detection ELISA* nachgewiesen werden, dass humane Melanomzelllinien unterschiedlicher Tumorprogressionsstadien resistent gegenüber einer izTRAIL-Dosis von 100 ng/ml sind. Hierbei wurde eine Apoptoserate von 10 % als resistent definiert. Zudem konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass auch eine massive Erhöhung der izTRAIL-Dosis (bis zu 1000 ng/ml) nicht zu einer Sensitivierung gegenüber TRAIL führt (Thayaparasingham, 2009). Durch eine simultane Behandlung mit per sé sublethaler UVB-Strahlung von 20 mJ/cm² konnten Melanomzellen jedoch, unabhängig vom Tumorprogressionsstadium, synergistisch für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden, während primäre Melanozyten resistent blieben (Abb.: 3.1).

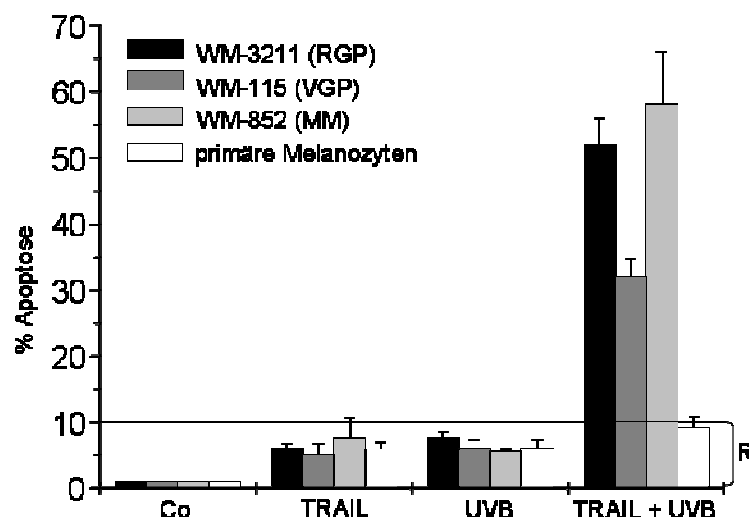


Abb. 3.1: UVB vermittelt die Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose. Primäre Melanozyten wurden ebenso wie drei humane Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstadien jeweils mit 100 ng/ml izTRAIL oder 20 mJ/cm² UVB alleine oder kombiniert stimuliert. Nach 16 h wurde die Apoptoserate mittels *Cell Death Detection ELISA* ermittelt. Eine Apoptoserate unter 10 % wurde als Resistenz (R) definiert.

Sowohl für die Resistenz der Melanomzellen gegenüber TRAIL, als auch für die Sensitivierung durch UVB-Strahlung zeigte sich der „*crosstalk*“ zwischen der Effektor-Caspase-3 und dem potenten Inhibitor XIAP als ausschlaggebend. Western Blot Analysen von Melanomzellen dreier Progressionsstadien zeigten, dass die alleinige izTRAIL-Stimulation lediglich in einer partiellen Caspase-3-Prozessierung zum katalytisch inaktiven p21-Intermediat resultierte, wobei der XIAP-Gehalt in der Zelle unverändert blieb. Durch alleinige UVB-Stimulation änderten sich die Proteinverhältnisse von XIAP und Caspase-3 in den Zellen gegenüber der Kontrolle nicht, da es sich per Definition um einen sublethalen Stimulus handelte. Wurde jedoch izTRAIL mit der UVB-Bestrahlung kombiniert, korrelierte eine vollständige Prozessierung der Caspase-3 in ihr katalytisch aktives p17-Fragment mit einer Depletion des spezifischen Inhibitors XIAP. In primären Melanozyten hingegen konnte weder eine Caspase-3-Prozessierung, noch XIAP-Depletion unter den angegebenen Stimulationen beobachtet werden, was für deren persistierende Resistenz spricht (Abb. 3.2).

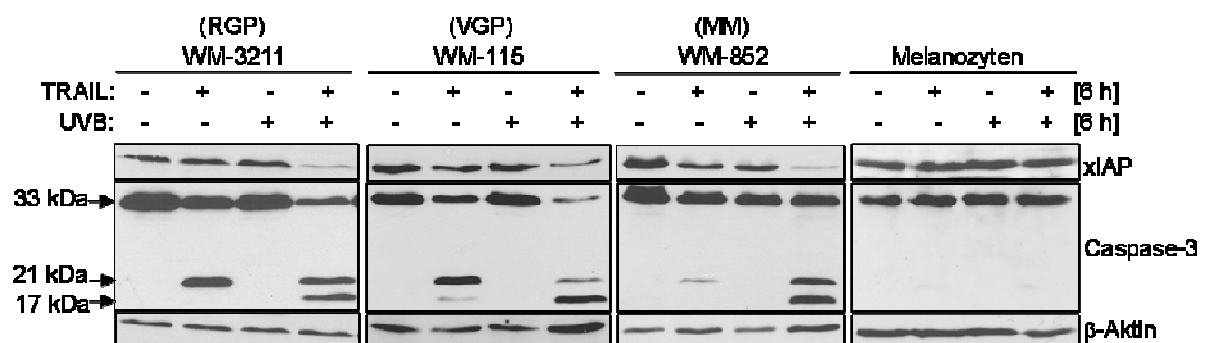


Abb. 3.2: Die UVB-vermittelte Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose korreliert mit einer vollständigen Caspase-3-Prozessierung sowie XIAP-Depletion. Primäre Melanozyten ebenso wie drei humane Melanomzelllinien wurden jeweils mit 100 ng/ml izTRAIL oder 20 mJ/cm² UVB alleine sowie in Kombination stimuliert. Nach 6 h wurde der Proteinstatus von XIAP und Caspase-3 im Western Blot dokumentiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Laut Literatur wird die Depletion von XIAP über proteasomale Degradierung vermittelt (Sohn et al., 2006; Yang, 2000b). Durch Inhibition des 26S-Proteasoms mit dem spezifischen Inhibitor MG132 sollte in diesem Fall die Depletion von XIAP verhindert werden. Die proteasomale Inhibition erzielte in den drei untersuchten Melanomzelllinien (WM-3211, WM-115, WM-852) jedoch nicht die Bewahrung des vollständigen XIAP-Proteins (55 kDa) nach Kostimulation mit izTRAIL und UVB, sondern lediglich die Akkumulation eines trunkierten 29 kDa großen Fragmentes (Abb. 3.3). In primären Melanozyten konnte, wie erwartet, keine XIAP-Depletion auch

infolge hoher Stimulations-Dosen (500 ng/ml izTRAIL + 40 mJ/cm² UVB) nachgewiesen werden, was für die Tumorselektivität des zugrundeliegenden Mechanismus spricht.

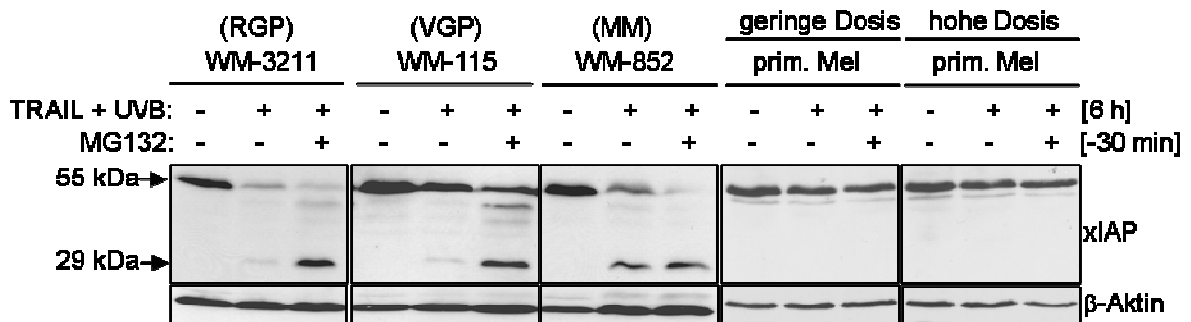


Abb. 3.3: Die Depletion von XIAP erfolgt über ein trunkiertes Intermediat. Primäre Melanozyten ebenso wie drei humane Melanomzelllinien wurden mit 20 µM MG132 30 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit izTRAIL (100 ng/ml) und UVB (20 mJ/cm²). Die primären Melanozyten wurden zusätzlich mit einer hohen Dosis (500 ng/ml izTRAIL und 40 mJ/cm²) behandelt. Nach 6 h wurde der zelluläre XIAP-Status mittels Western Blot Analyse untersucht. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.2 Die XIAP-Trunkierung ist eine Caspase-abhängiger Prozess

Die Arbeitsgruppe von Deveraux publizierte erstmals einen Hinweis auf eine potentielle Caspase-Spaltstelle innerhalb der XIAP-Proteinsequenz an Position 242 (Deveraux et al., 1999). *In vitro* Studien zeigten eine potentielle Spaltbarkeit von XIAP durch rekombinante Caspasen, *in vivo* gab es allerdings bislang keine Hinweise auf eine biologische Relevanz dieses Prozesses. Um zu untersuchen, ob es sich bei der beobachteten XIAP-Trunkierung um eine Caspase-abhängige Spaltung handelt, wurden definierte Caspasen durch Präinkubation der Zellen mit spezifischen Caspase-Inhibitoren blockiert. Die durch Kostimulation mit izTRAIL und UVB induzierte XIAP-Depletion konnte durch Inhibition der Caspasen-8, -6, und -3 verhindert werden. Entsprechend wurde die Akkumulation des trunkierten 29 kDa XIAP-Fragments vollständig in Zellen verhindert, die zuvor mit dem Proteasom-inhibitor MG132 behandelt wurden. Diese Ergebnisse wiesen eindeutig darauf hin, dass eine Caspase-abhängige Spaltung die Voraussetzung für eine anschließende proteasomale Degradierung von XIAP ist. Insgesamt zeigte die Inhibition von Caspase-9 (+ zLEHD) den geringsten Effekt auf die XIAP-Depletion. Es ist daher unwahrscheinlich, dass Caspae-9 für die XIAP-Spaltung verantwortlich war.

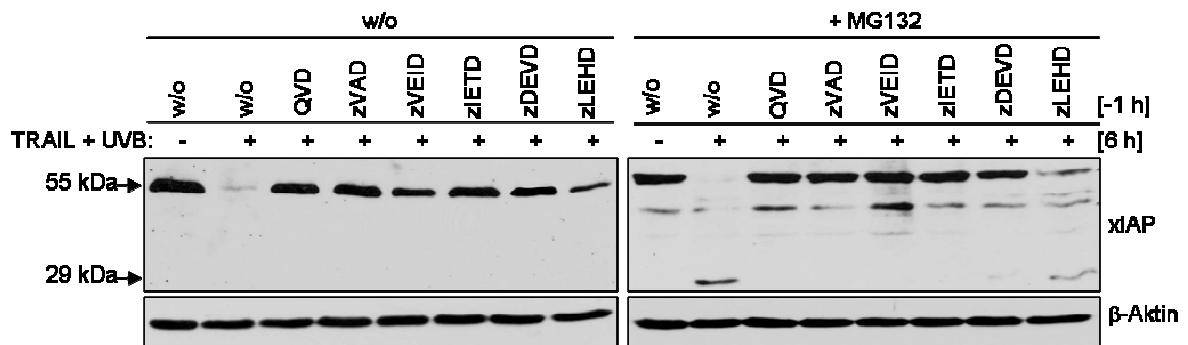


Abb. 3.4: Die Spaltung von XIAP ist Caspase-abhängig. Die Melanomzelllinie WM-115 wurde 30 min mit und ohne den Proteasominhibitor MG132 (20 μ M) vorinkubiert. 1 h vor Stimulation wurden spezifische Caspase-Inhibitoren (20 μ M) zugegeben und Apoptose durch 100 ng/ml izTRAIL + 20 mJ/cm² UVB induziert. Der XIAP-Status wurde 6 h nach Apoptoseinduktion in einem Western Blot dokumentiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

w/o = *without* (hier: ohne Inhibitoren); QVD, zVAD = Pan-Caspase-Inhibitoren; zVEID = Caspase-6-Inhibitor; zIETD = Caspase-8-Inhibitor; zDEVD = Caspase-3-Inhibitor; zLEHD = Caspase-9-Inhibitor

Entsprechend zeigte die Inhibition von Caspase-9 auch den geringsten Effekt auf die durch TRAIL-UVB-Kostimulation induzierte Apoptose (gestreifter Balken, Abb. 3.5).

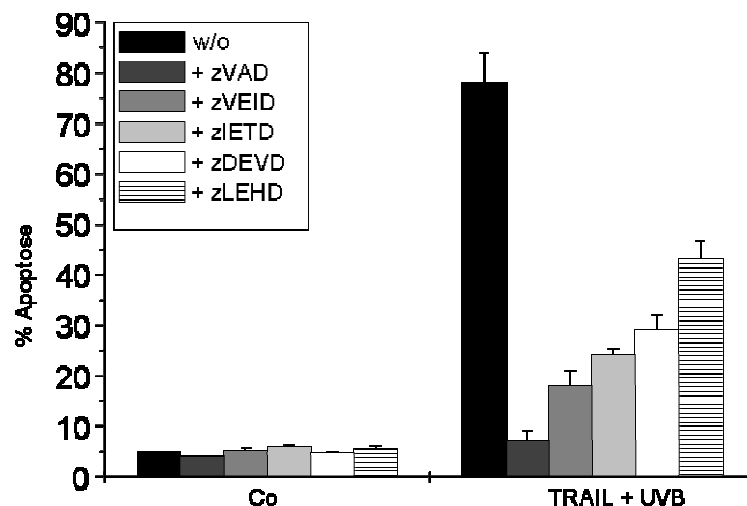


Abb. 3.5: Die Inhibition von Caspase-9 hat den geringsten Einfluss auf die Apoptoserate. WM-115-Zellen wurden 1 h mit spezifischen Caspase-Inhibitoren vorinkubiert (20 μ M). Die Induktion von Apoptose erfolgte mit 100 ng/ml izTRAIL und 20 mJ/cm² UVB. Nach 16 h wurde die Apoptose in einem *Cell Death Detection ELISA* ermittelt.

w/o = *without* (hier: ohne Inhibitoren); zVAD = Pan-Caspase-Inhibitor; zVEID = Caspase-6-Inhibitor; zIETD = Caspase-8-Inhibitor; zDEVD = Caspase-3-Inhibitor; zLEHD = Caspase-9-Inhibitor

Um zu verifizieren, dass eine proteasomale Degradierung von XIAP tatsächlich eine initiale Caspase-abhängige Spaltung voraussetzt, wurde das Caspase-spezifische Aspartat (D) in der potentiellen Erkennungssequenz zu Glutaminsäure (E) mutiert. In Western Blot Analysen zeigte sich das mutierte XIAP-Protein (D242E) im Gegensatz zum Wildtyp-XIAP-Protein unter apoptotischen Bedingungen als resistent gegen die Depletion (Abb. 3.6). Die Inhibition des Proteasoms erzielte wiederholt keine

Bewahrung des wt-XIAP-Volllängen-Proteins. Dieses Ergebnis bestätigte, dass XIAP unter apoptotischen Bedingungen hinter dem Aspartat 242 Caspase-abhängig gespalten wurde.

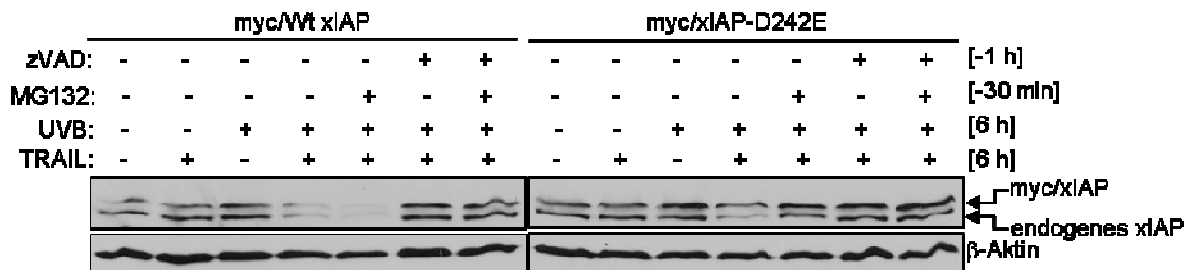


Abb. 3.6: XIAP wird hinter Asp-242 Caspase-abhängig gespalten. WM-115-Zellen wurden mit wt-XIAP oder XIAP-D242E transfiziert. 24 h später wurden die Zellen entweder mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD (20 µM) und / oder mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (20 µM) vorinkubiert und anschließend mit 100 ng/ml izTRAIL alleine, 20 mJ/cm² UVB alleine oder mit izTRAIL + UVB kostimuliert. Der Abbau des Volllängen-XIAP-Proteins wurde nach 6 h in einer Western Blot Analyse dokumentiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

In Melanomzellen konnte der XIAP-Proteinstatus als ausschlaggebendes Kriterium der TRAIL-Suszeptibilität identifiziert werden. Die ektopische Expression des wt-XIAP-Proteins reduzierte erwartungsgemäß die Apoptoserate nach TRAIL-UVB-Kostimulation in WM-115-Zellen. Die unspaltbare XIAP-Variante (D242E) demonstrierte dabei eine nochmals deutlich gesteigerte Kompetenz zur Apoptoseinhibition, was eine Caspase-induzierte Eliminierung von XIAP zur effektiven Induktion von Apoptose bestätigte (Abb. 3.7).

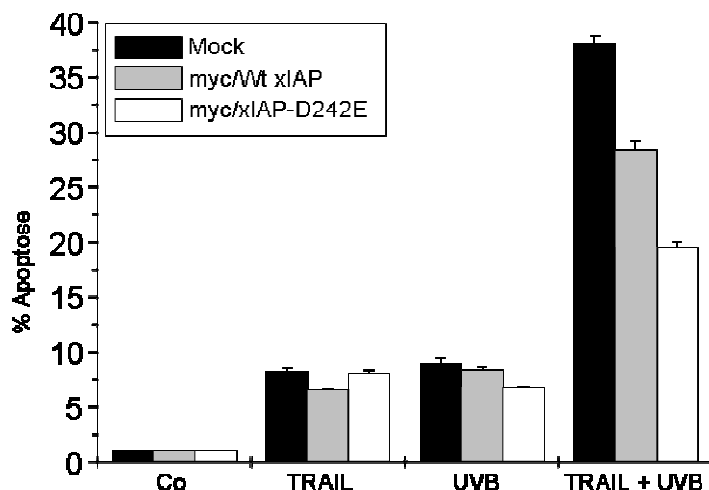


Abb. 3.7: Die unspaltbare XIAP-Mutante (D242E) inhibiert Apoptose effektiver als wt-XIAP. WM-115-Zellen wurden entweder mit der unspaltbaren XIAP-Variante (D242E) oder dem wt-XIAP-Protein transfiziert. 24 h später wurden beide Transfektanten jeweils mit 100 ng/ml izTRAIL alleine, 20 mJ/cm² UVB alleine oder kombiniert stimuliert. Nach 16 h wurde die Apoptose im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen (mock) mittels *Cell Death Detection ELISA* bestimmt.

Die Auswirkung der XIAP-Proteinkonzentration auf die Caspase-3-Prozessierung wurde untersucht, wodurch auch die Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden sollte. Eine Vorinkubation mit verschiedenen Caspase-Inhibitoren unterdrückte wie erwartet die Caspase-induzierte Depletion von XIAP unter apoptotischen Bedingungen und führte entsprechend lediglich zu einer partiellen Prozessierung von Caspase-3 in sein katalytisch inaktives p21-Fragment. Die Inhibition der Caspase-8 (+ zIETD) führte unabhängig vom XIAP-Proteinstatus zu einer vollständigen Unterdrückung der Caspase-3-Prozessierung, da die untersuchten WM-115-Melanomzellen als Typ I-Zellen vorrangig über den Rezeptor-vermittelten Signalweg Apoptose induzieren und somit Caspase-8-Aktivität essentiell für die Aktivierung von Caspase-3 ist.

Nach einem XIAP-*knock down* zeigte sich hingegen eine verstärkte und vollständige Caspase-3-Prozessierung in sein katalytisch aktives p17-Fragment, was die direkte inhibitorische Wirkung von XIAP auf Caspase-3 impliziert. Eine Inhibition der Caspase-9 ließ unter XIAP-depletierten Bedingungen ebenfalls eine gesteigerte vollständige Caspase-3-Prozessierung zu, da unter diesen Bedingungen Caspase-8 noch aktiv ist und diese somit Caspase-3 prozessieren kann.

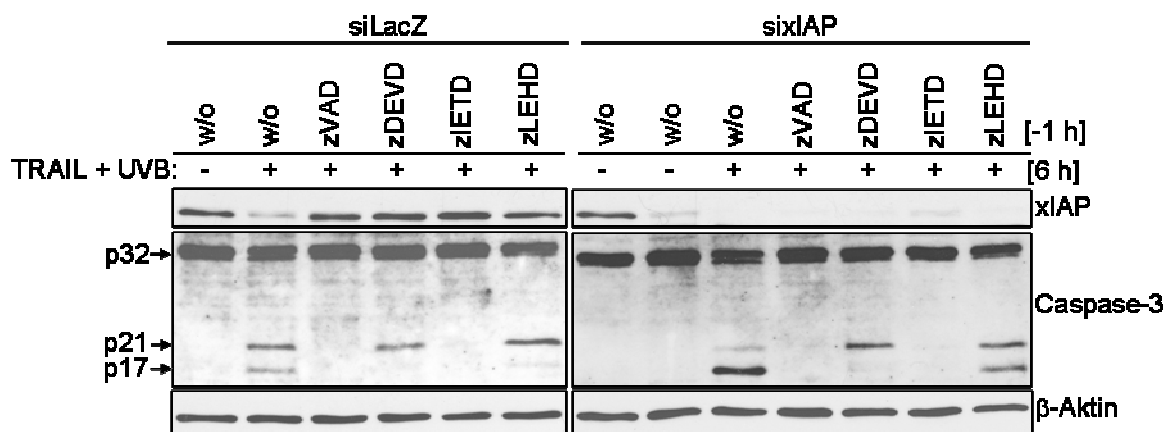


Abb. 3.8: Ein XIAP-*knock down* ermöglicht eine vollständige Caspase-3-Prozessierung. Der XIAP-Proteinstatus in WM-115-Zellen wurde experimentell reduziert. 1 h vor TRAIL-UVB-Kostimulation (100 ng/ml izTRAIL, 20 mJ/cm² UVB) wurden Caspase-Inhibitoren (20 μM) zugegeben und die Caspase-3-Prozessierung nach weiteren 6 h in einem Western-Blot visualisiert. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

zVAD = Pan-Caspase-Inhibitor; zVEID = Caspase-6-Inhibitor; zIETD = Caspase-8-Inhibitor; zDEVD = Caspase-3-Inhibitor; zLEHD = Caspase-9-Inhibitor

Eine effektive Inhibition der Caspase-3-Aktivität durch XIAP konnte zudem in einem Caspase-Aktivitäts-Assay bestätigt werden. Die ektopische Expression von XIAP hatte kaum Einfluss auf den Aktivitätsstatus der Initiator-Caspasen-8 und -9,

resultierte jedoch in einer signifikanten Reduktion der Caspase-3-Aktivität. Auch hierbei zeigte sich die unspaltbare XIAP-Mutante (D242E) wiederum potenter, was wiederholt auf die Notwendigkeit einer durch proteolytische Spaltung induzierten Eliminierung von XIAP für die effektive Aktivierung von Caspase-3 hinwies.

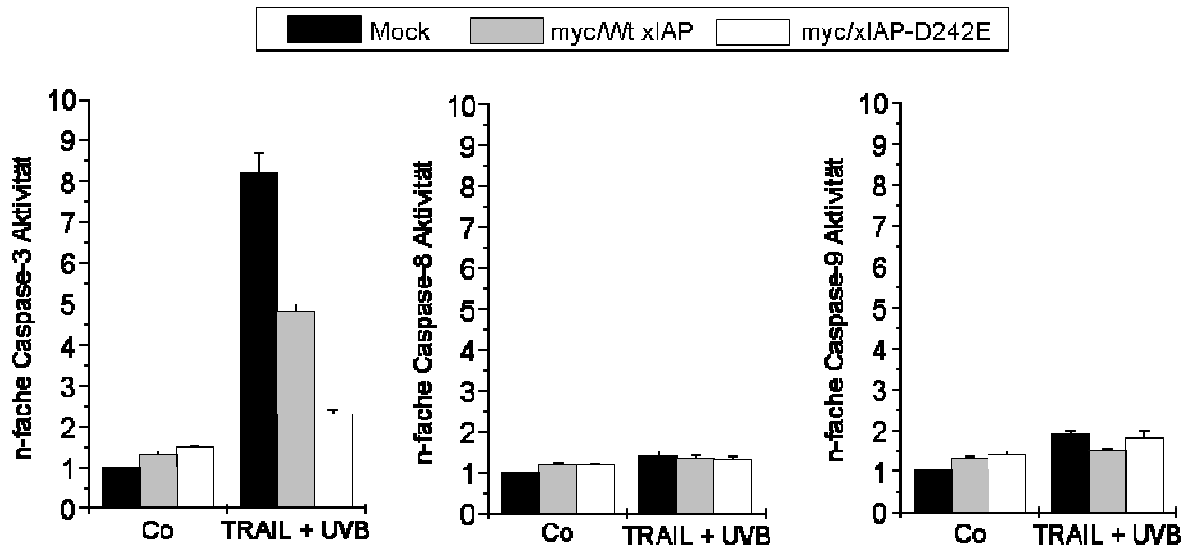


Abb. 3.9: Die unspaltbare XIAP-Variante inhibiert Caspase-3 am stärksten. WM-115-Zellen wurden mit der unspaltbaren XIAP-Variante (D242E) oder mit wt-XIAP transfiziert. Nach 6 h Kostimulation (100 ng/ml izTRAIL + 20 mJ/cm² UVB) wurde die Aktivität der Caspasen-3, -8 und -9 in einem Caspase-Aktivitäts-Assay bestimmt. Als Kontrolle dienten mit Leervektor-transfizierte Zellen (mock).

3.1.3 XIAP wird durch Caspase-3 gespalten

Um die XIAP-spaltende Caspase zu identifizieren, wurde die Proteinkonzentration der bedeutendsten apoptotischen Caspasen (-3, -6, -8, -9) in WM-115-Zellen durch siRNA-vermittelten *knock down* stark reduziert und der XIAP-Proteinstatus unter apoptotischen Bedingungen dokumentiert.

Lediglich ein *knock down* von Caspase-3, nicht aber von den Caspasen -6, -8 und -9, resultierte in der Restabilisierung des XIAP-Volllängen-Proteins, was verdeutlicht, dass die XIAP-Spaltung tatsächlich ein Caspase-3-abhängiger Prozess ist (Abb. 3.10).

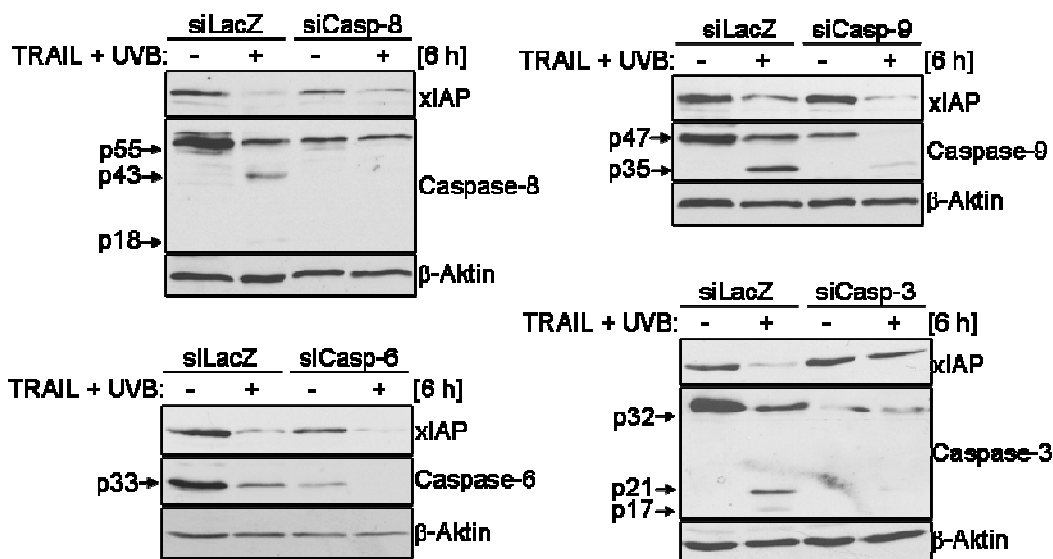


Abb. 3.10: Während der Exekution von Apoptose wird XIAP durch Caspase-3 gespalten. Die Expression der Caspasen-3, -6, -8 und -9 wurden mittels siRNA-Transfektion spezifisch *ge-silenced*. Nach 6 h 100 ng/ml izTRAIL + 20 mJ/cm² UVB-Kostimulation wurde die Depletion des XIAP-Proteins im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

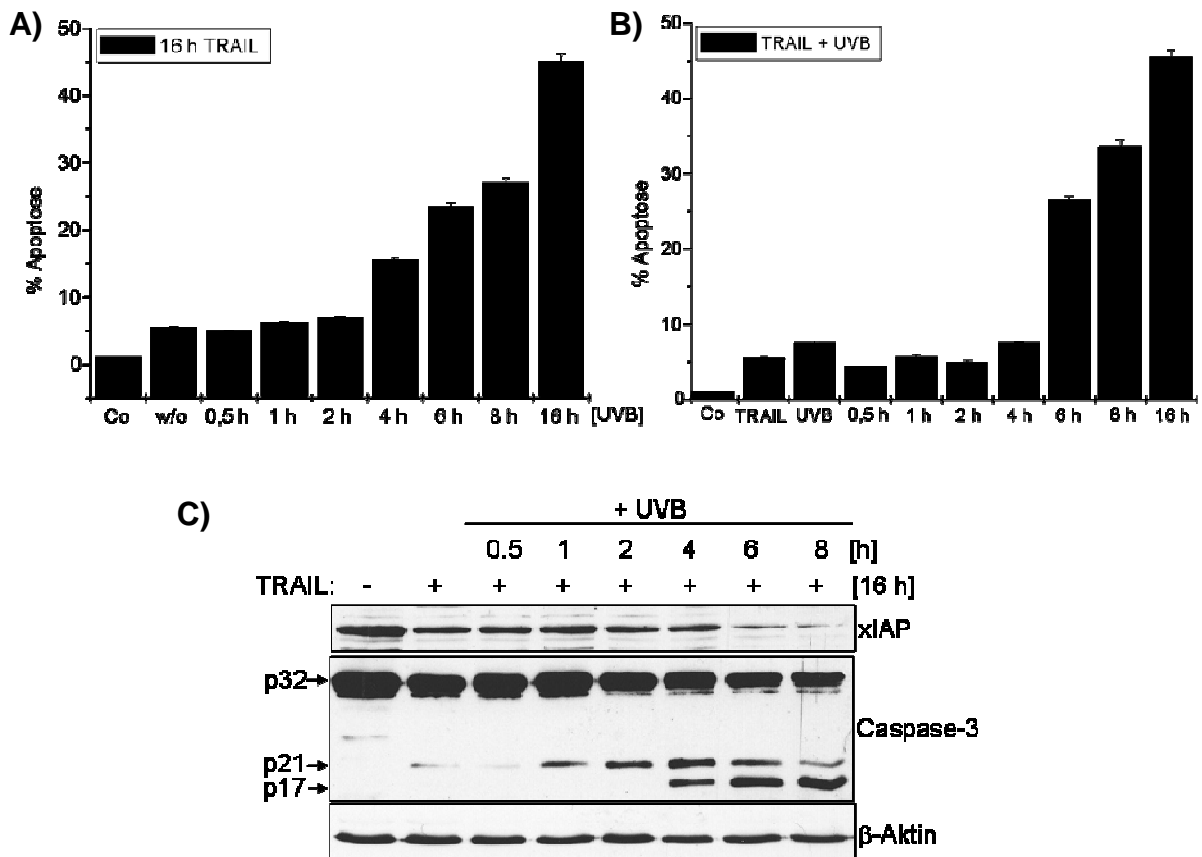
3.1.4 Die synergistische Induktion von Apoptose erfordert mitochondriale Dysfunktion

Um näher zu beleuchten, wie die XIAP-Depletion bei Kombination beider per sé sublethaler Stimuli initiiert wird, wurde die Auswirkung der UVB-Bestrahlung auf den Verlauf der Apoptoseinduktion näher analysiert. Eine TRAIL-UVB-Kostimulation resultierte nach 4 - 6 h in der Induktion von Apoptose (Abb. 3.11 **B**). Nach 16-stündiger izTRAIL-Vorstimulation hingegen setzte die Apoptose bereits 4 h nach UVB-Bestrahlung ein (Abb. 3.11 **A**). Nach izTRAIL-Einzelstimulation findet bereits eine partielle Caspase-3-Prozessierung in sein katalytisch inaktives p21-Intermediat statt, wie in Western Blot Analysen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.2). Somit kann der finale Prozessierungsschritt nach Depletion von XIAP durch UVB-Bestrahlung rascher vollzogen werden, wodurch die Apoptose früher induziert wird. Dies ließ sich ebenfalls auf Proteinebene durch Nachweis der vollständigen Caspase-3-Prozessierung mit simultaner Depletion des XIAP-Proteins nachweisen (Abb. 3.11 **C**).

Es wurde bereits mehrfach publiziert, dass XIAP durch den pro-apoptotischen Faktor Smac/Diablo eliminiert werden kann. Studien konnten dabei eine direkte Bindung von zytosolischem Smac/Diablo an XIAP zeigen, wodurch eine vollständige Aktivierung von Caspase-3 ermöglicht wird (Chai et al., 2000; Srinivasula et al.,

2001). Im *crosstalk* zwischen Caspase-3 und XIAP könnte der natürliche Antagonist von XIAP somit eine entscheidende Rolle spielen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien nach UVB-Bestrahlung untersucht (Abb. 3.11 D)).

Sowohl Cytochrom C, als auch Smac/Diablo konnten 4 h nach UVB-Bestrahlung in den zytosolischen Fraktionen sukzessiv behandelter Melanomzellen (nach 16 h izTRAIL-Vorstimulation) detektiert werden (Abb. 3.11 D)). Dies bestätigt, dass die zusätzliche UVB-Bestrahlung zur Involvierung des intrinsischen mitochondrialen Signalweges führt und eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge hat. Freigesetztes Cytochrom C führt bekanntermaßen zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9 (Shi, 2006). Da diese jedoch in den vorangegangenen Untersuchungen als ausführende Protease der XIAP-Spaltung ausgeschlossen werden konnte, wurde der Fokus in den weiteren Experimenten auf den potentiellen Einfluss von Smac/Diablo auf die XIAP-Depletion nach UVB-Behandlung gelegt.



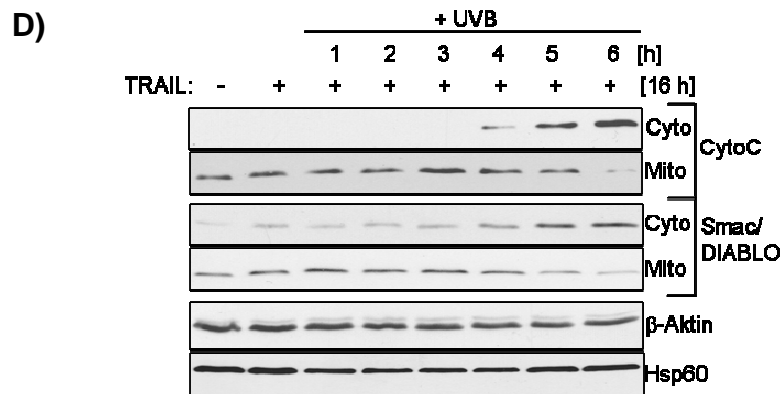


Abb. 3.11: In WM-115-Zellen wird Apoptose 4 - 6 h nach TRAIL-UVB-Kostimulation induziert und geht mit mitochondrialer Dysfunktion einher. WM-115-Zellen wurden **A)** simultan mit 100 ng/ml izTRAIL + 20 mJ/cm² UVB oder **B)** sukzessiv mit UVB nach vorangegangener 16-stündiger izTRAIL-Stimulation bestrahlt. Die Apoptose wurde über 16 h zu den angegebenen Zeitpunkten in einem *Cell Death Detection ELISA* dokumentiert. Auf biochemischer Ebene wurde **C)** die Caspase-3-Prozessierung nach sukzessiver Behandlung (16 h izTRAIL-Vorstimulation mit anschließender UVB-Bestrahlung) zu den angegebenen Zeitpunkten und **D)** durch Dokumentation der Cytochrom C- und Smac/Diablo-Freisetzung aus den Mitochondrien in zytosolischen und mitochondrialen Proteinextrakten verfolgt. β -Aktin diente als Ladekontrolle für die zytosolischen Extrakte, Hsp60 hingegen für die mitochondrialen Proteinlysate.

3.1.5 Smac/Diablo erleichtert die synergistische Induktion von Apoptose

Die ektopische Expression von Smac/Diablo resultierte in Melanomzellen in einer verstärkten vollständigen Caspase-3-Prozessierung mit simultaner XIAP-Depletion unter apoptotischen Bedingungen. Die reife, zytosolische Smac/Diablo-Variante zeigte sich dabei potenter als die wt-Smac-Variante, die nach ektopischer Expression für ihre Funktionalität erst noch der Prozessierung bedurfte (Abb. 3.12 **B**). Bedeutenderweise zeigte sich sogar bereits nach izTRAIL-Einzelstimulation die katalytisch aktive p17-Bande von Caspase-3 (Abb. 3.12 **B**). Dazu passend konnte in izTRAIL-Einzelstimulierten Melanomzellen nach ektopischer Expression von Smac/Diablo die Induktion von Apoptose dokumentiert werden (Abb. 3.12 **C**).

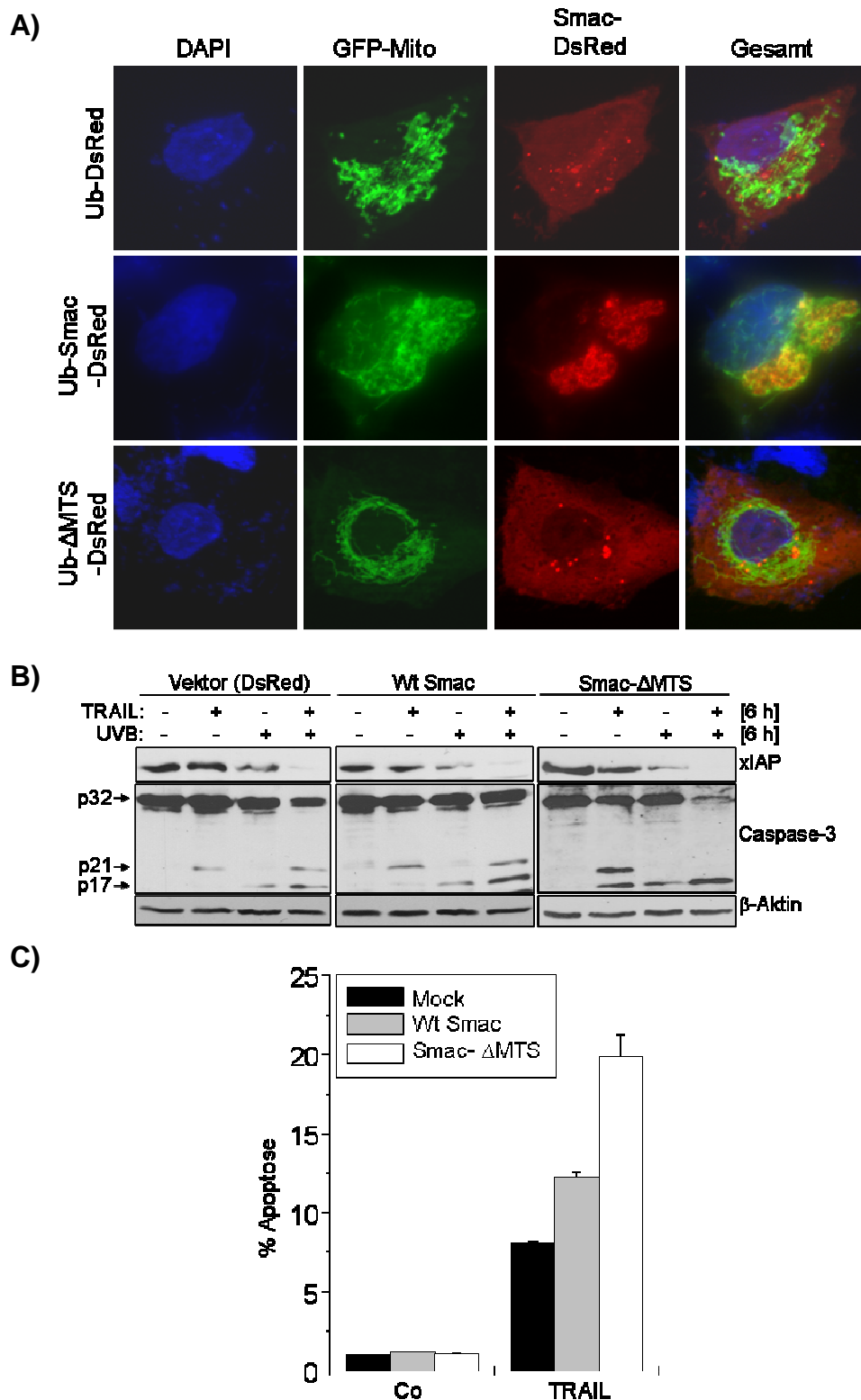


Abb. 3.12: Smac/Diablo erleichtert eine vollständige Caspase-3-Prozessierung mit simultaner XIAP-Depletion und trägt zur synergistischen Induktion von Apoptose bei.

A) Zur Überprüfung der Lokalisation der Smac-Varianten wurden WM-115-Melanomzellen mit einer wt-Smac-Variante sowie reifem zytosolischem Smac ohne MTS (Δ MTS) transfiziert. Nach 24 h wurden die Nuklei mit 1 μ g/ml DAPI angefärbt und die Lokalisation der Smac-Varianten mittels IF-Mikroskopie überprüft. Als Marker für die Mitochondrien diente mito-pEGFP. 24 h nach Transfektion der DsRed-markierten Smac/Diablo-Varianten wurde die Lokalisation per Mitotracker und konfokaler Mikroskopie dargestellt.

B + C) Die Transfektanten wurden mit 100 ng/ml izTRAIL- bzw. 20 mJ/cm² UVB einzeln sowie kombiniert stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde **B)** die XIAP-Depletion sowie die Caspase-3-Prozessierung in Western Blots analysiert (Ladekontrolle β -Aktin) und **C)** nach 16 h mittels *Cell Death Detection ELISA* die Apoptoserate bestimmt.

Co = Control (Kontrolle, hier: unstimuliert); Mock/Vektor (DsRed) = Leervektor; Wt Smac = Ub-Smac-DsRed; Smac- Δ MTS = Ub- Δ MTS-DsRed

Im Umkehrerperiment ließ sich die durch izTRAIL- und UVB-induzierte Apoptose in Zellen durch *knock down* von Smac/Diablo nicht vollständig, sondern nur partiell reduzieren (Abb. 3.13 **A**). Eine vollständige Blockierung des intrinsischen mitochondrialen Amplifikationswegs durch Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins hingegen, führte zu einem massiven Rückgang der Apoptose in izTRAIL+UVB-stimulierten Melanomzellen (Abb. 3.13 **B**). Zusammenfassend scheint Smac/Diablo eine wichtige, jedoch keine ausschließliche Rolle bei der Sensitivierung humaner Melanomzellen zu spielen. Die Beteiligung anderer mitochondrialer Proteine ist daher ebenfalls indiziert.

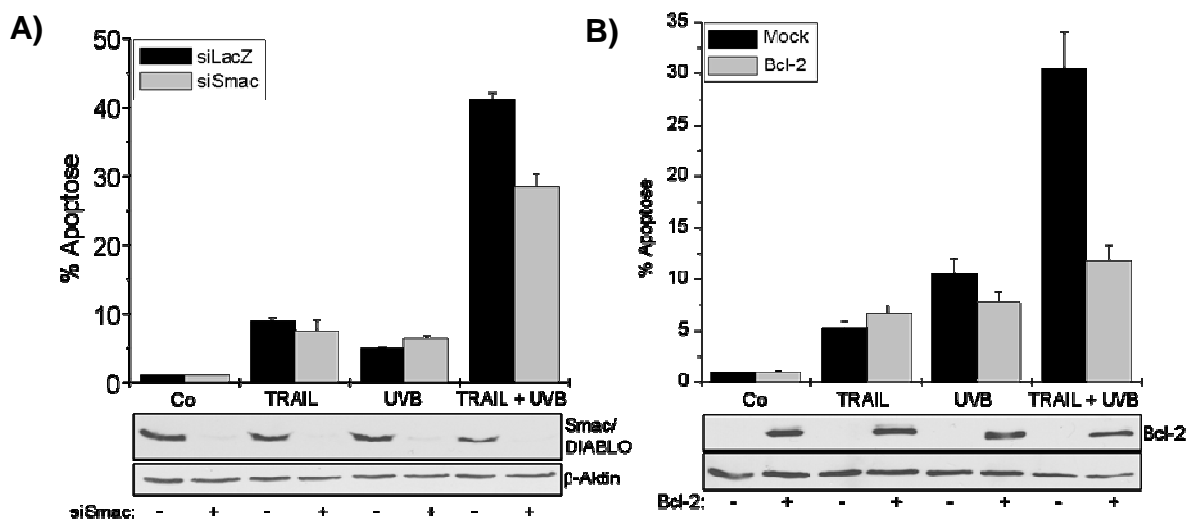


Abb. 3.13: Smac/Diablo ist nicht alleine für die synergistische Induktion von Apoptose in Melanomzellen nach Kostimulation verantwortlich. **A)** Nach *knock down* von Smac/Diablo wurden WM-115-Zellen mit 100 ng/ml izTRAIL-, 20 mJ/cm² UVB jeweils alleine oder kombiniert stimuliert. **B)** Bcl-2 wurde ektopisch in WM-115 exprimiert und die Zellen wie in **A)** stimuliert. Nach 16 h wurde die Apoptoserate mit Hilfe des *Cell Death Detection ELISA* bestimmt und der *knock down* bzw. die Überexpression in Western Blots überprüft. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Mock = Leervektor-transfizierte Zellen

3.1.6 Cisplatin sensitiviert Melanomzellen ebenfalls für die TRAIL-induzierte Apoptose

Da UVB-Strahlung *in vivo* nur eine sehr geringe Eindringtiefe in die Haut aufweist und somit nicht für eine Therapie von tiefergelegenen Metastasen geeignet ist (Anderson and Parrish, 1981), sollte untersucht werden, ob durch homologe DNA-

schädigende Agenzien ein analoges Zellverhalten induziert werden kann. Eine Behandlung mit Cisplatin führt zu Basenmodifikationen, welche denselben Reparaturmechanismus wie UVB-Bestrahlung aktivieren, wodurch ein homologer molekularer Mechanismus induziert werden könnte. Daher sollte der zuvor identifizierte molekulare Mechanismus zur synergistischen Induktion von Apoptose durch izTRAIL in Kombination mit Cisplatin reproduziert werden.

Analog den Einzelstimulationen mit izTRAIL und UVB (siehe Abb. 3.1) führte eine Stimulation mit Cisplatin alleine (10 μM) in Melanomzellen nicht zur Induktion von Apoptose. Auch die alleinige Behandlung mit einer höheren Dosis Cisplatin (20 μM) resultierte lediglich in einer moderaten Apoptoserate von ca. 15 %. Jedoch konnte analog nach Kombinationsbehandlung von izTRAIL mit Cisplatin die synergistische Induktion von Apoptose in humanen Melanomzellen beobachtet werden. Primäre Melanozyten zeigten sich dabei unter allen Stimulationsbedingungen als resistent gegen die TRAIL-induzierte Apoptose und wurden auch durch die Kostimulation nicht sensitiviert (Abb. 3.14 **A**), was auf die Tumorselektivität dieser Kombinationsbehandlung schließen lässt. In Western Blot Analysen konnte lediglich unter den Apoptose-induzierenden Bedingungen eine vollständige Caspase-3-Prozessierung mit simultaner XIAP-Depletion beobachtet werden (Abb. 3.14 **B**). Zudem ließ sich durch Inhibition des 26S-Proteasoms das 29 kDa-XIAP-Fragment stabilisieren, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der synergistischen Induktion von Apoptose nach Kombinationsbehandlung mit izTRAIL und Cisplatin derselbe, zuvor aufgeklärte, molekulare Mechanismus zugrunde liegt.

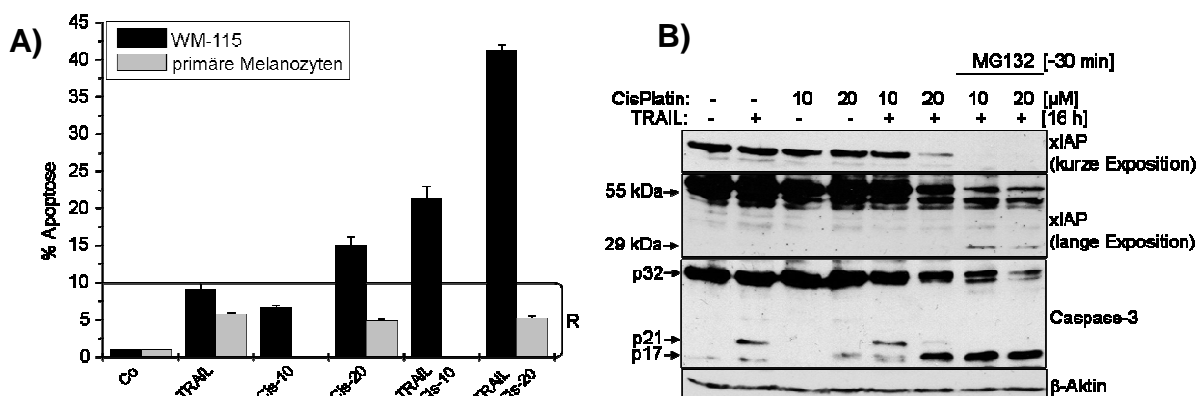


Abb. 3.14: Cisplatin sensitiviert humane Melanomzellen ebenfalls für die TRAIL-induzierte Apoptose. **A)** WM-115-Melanomzellen und primäre Melanozyten wurden mit zwei verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen (10 bzw. 20 μM) alleine, mit izTRAIL (100 ng/ml) alleine sowie kombiniert stimuliert. Nach 16 h wurde mit einem *Cell Death Detection ELISA* die Apoptose bestimmt. **B)** Die Melanomzellen WM-115 wurden wie in **A)** beschrieben stimuliert und zusätzlich mit MG132 30 min vorinkubiert. Die XIAP-Depletion sowie die Caspase-3-Prozessierung wurden in einem Western Blot

dokumentiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass initial TRAIL-resistente Melanomzellen durch Kombinationsbehandlung mit einer sublethalen UVB-Dosis bzw. Cisplatin für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden können. Der UVB-Stimulus involviert dabei die mitochondrialen pro-apoptotischen Faktoren Cytochrom C und Smac/Diablo, die zur Antagonisierung der inhibitorischen XIAP-Wirkung beitragen. Freigesetzte Caspase-3 initiiert daraufhin den proteasomalen Abbau von XIAP durch dessen direkte Spaltung, was in einer massiven Verstärkung des apoptotischen Signals und somit in der synergistischen Induktion und Exekution von Apoptose resultiert. Dieser Mechanismus kann analog durch alternative DNA-schädigende Agenzien induziert werden, was für dessen klinische Relevanz spricht. Somit könnte der aufgeklärte molekulare Mechanismus eine Grundlage zur Entwicklung alternativer Therapieansätze darstellen und einen wichtigen Beitrag im Kampf gegen den schwarzen Hautkrebs leisten.

3.2 Weitere Funktion von Caspase-8

Caspase-8 gilt als klassische pro-apoptotische Initiator-Caspase, deren essentielle Funktion bei der Induktion des Rezeptor-vermittelten Apoptosewegs mittlerweile etabliert ist (Schulze-Osthoff et al., 1998; Scaffidi et al., 1998; Peter et al., 2007). Allerdings konnte durch Depletion des Caspase-8-Proteins in Melanomzellen impliziert werden, dass dieser Protease noch mindestens eine weitere fundamentale Bedeutung zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase zukommt, da ein *knock down* des Proteins zur Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps mit klassischen Merkmalen wie Verlust der Adhärenz und Membran-blebbing führte (siehe Abb.3.15). Die Inhibition von Caspasen revertierte diesen Phänotypen jedoch nur partiell (Abb.3.15 + QVD), so dass von der Beteiligung weiterer molekularer Mechanismen an diesem Phänomen ausgegangen werden musste.

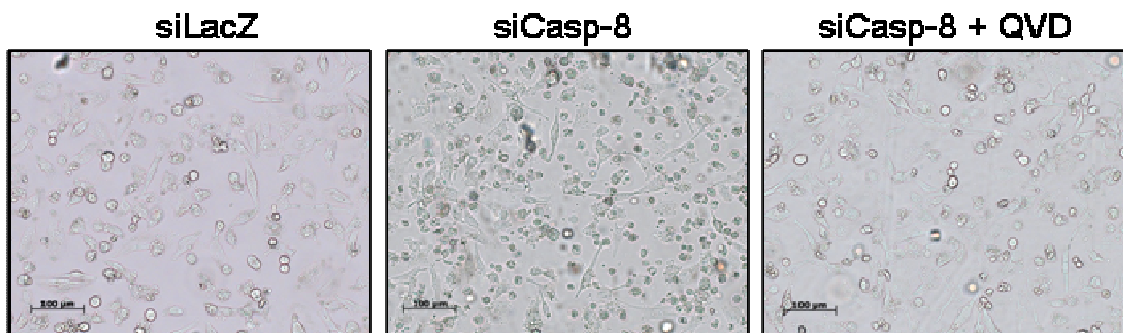


Abb.3.15: In Melanomzellen resultiert ein *knock down* von Caspase-8 in der Ausbildung eines apoptotischen Phänotypen, der nur partiell durch Caspase-Inhibition revertierbar ist. WM-115-Zellen wurden mit siLacZ- bzw. siCasp-8-RNA transfiziert und nach 72 h im Durchlichtmikroskop photographiert. In einem Ansatz wurde die Aktivität von Caspasen mittels QVD (20 µM) inhibiert. QVD = Pan-Caspase-Inhibitor; Maßstabsbalken: 100 µm.

3.2.1 Eine Caspase-8-Defizienz verändert das Zellzyklusprofil und resultiert in einer erhöhten Apoptoserate

Nach 72-stündiger Inkubation waren Caspase-8-depletierte Melanomzellen im Vergleich zu Kontrollzellen sehr viel weniger konfluent. Eine Zellzyklusanalyse Caspase-8-depletierter Melanomzellen enthüllte ein verändertes Zellzyklusprofil, in welchem sich die Zellzahl der G2/M-Population zugunsten der apoptotischen subG1-Fraktion verringerte und entsprechend mit einer signifikant erhöhten Caspase-3-Aktivität einher ging (Abb. 3.16).

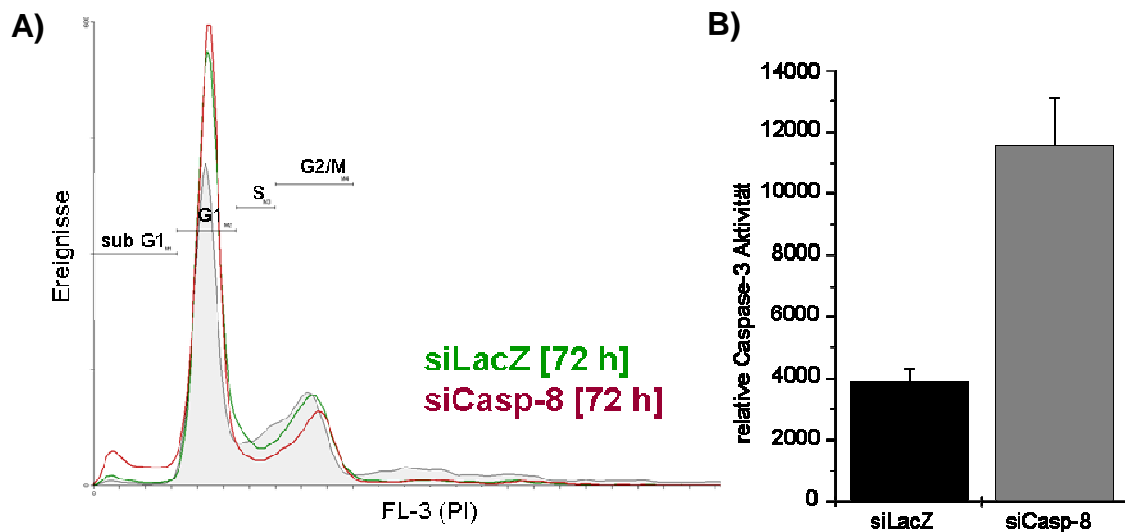


Abb. 3.16: Eine Depletion von Caspase-8 verändert das Zellzyklusprofil und resultiert in einer erhöhten Apoptoserate. Caspase-8 wurde in WM-115-Zellen mittels *knock down* depletiert und nach 72 h **A)** der Zellzyklus nach Nicoletti-Färbung im Durchflußzytometer analysiert sowie **B)** ein *Cell Death Detection ELISA* durchgeführt. Die graue Kurve in **A)** repräsentiert untransfizierte und unbehandelte Zellen als Referenz.

3.2.2 Caspase-8-defiziente Melanomzellen arretieren in der S-Phase des Zellzyklus

Eine zusätzliche Synchronisation der Melanomzellpopulation verdeutlichte einen arretierenden Effekt der Caspase-8-Depletion innerhalb der S-Phase des Zellzyklus (Abb. 3.17). Somit konnte vermutet werden, dass Caspase-8 in Melanomzellen eine bedeutende Rolle während dieser Phase und somit für die Progression durch den Zellzyklus zukommt.

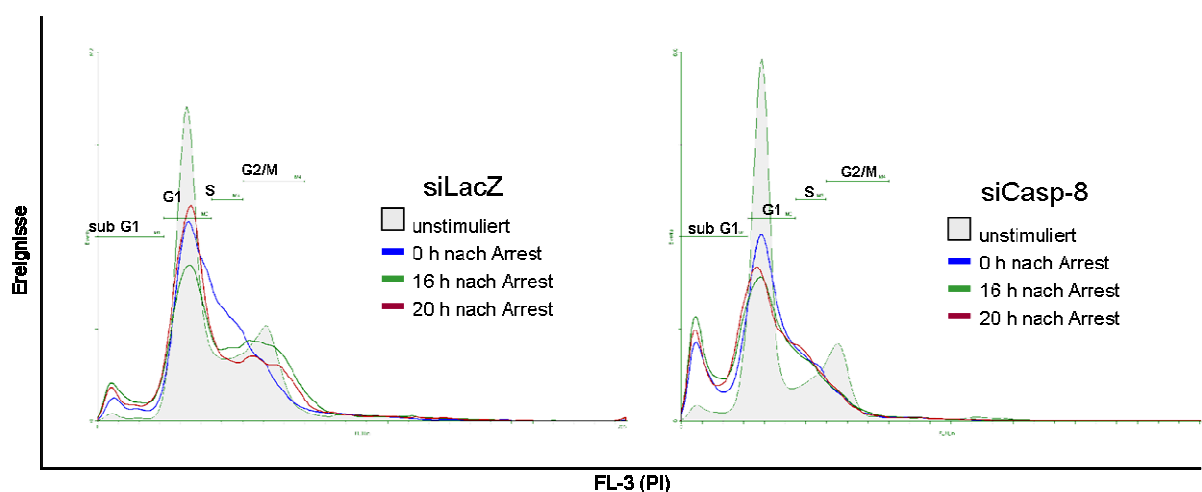


Abb. 3.17: Caspase-8-defiziente Melanomzellen arretieren in der S-Phase des Zellzyklus. Caspase-8 wurde in WM-115-Zellen spezifisch depletiert und die Zellen mittels Doppel-Thymidinblock synchronisiert. Proben wurden während des S-Phase-Blocks sowie 16 h und 20 h nach Entlassung aus dem Arrest genommen und das Zellzyklusprofil nach Nicoletti-Färbung im

Durchflußzytometer untersucht. Die grauen Kurven repräsentieren untransfizierte und unbehandelte Zellen als Referenz.

0 h nach Arrest = S-Phase-Arrest

Visuell konnte diese Arretierung des Zellzyklus über einen Mitose-spezifischen Marker (Phospho Histon H3) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu mock-transfizierten Melanomzellen waren Caspase-8-depletierte WM-115-Zellen auch 20 h nach Entlassung aus dem Thymidinblock nicht in die Metaphase des Zellzyklus eingetreten (Abb. 3.18).

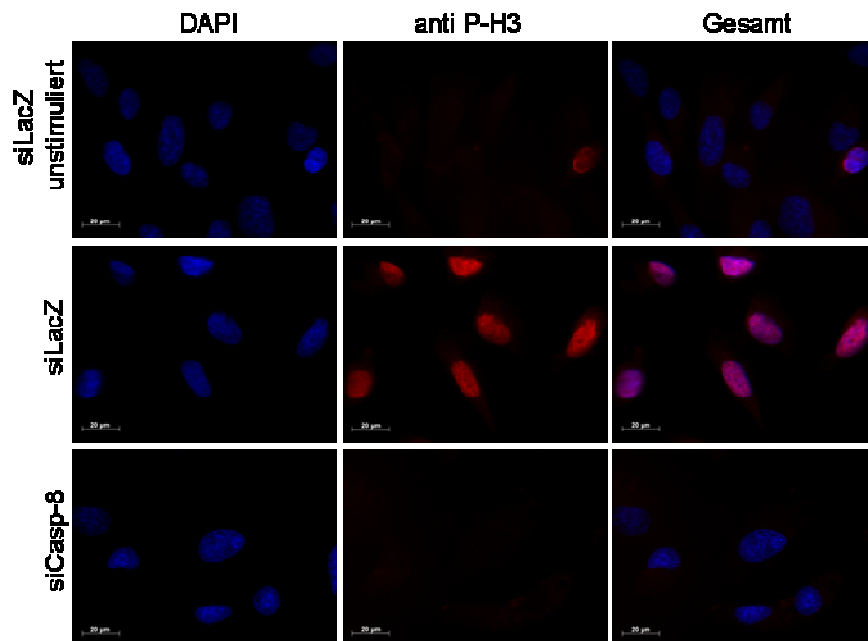


Abb. 3.18: Caspase-8-depletierte Melanomzellen transitieren nicht in die G2/M-Phase des Zellzyklus. Caspase-8 wurde in synchronisierten WM-115-Zellen depletiert. 20 h nach Entlassung aus dem Arrest wurde die Transition in die G2/M-Phase über Phospho-Histon H3-Färbung dokumentiert. Die Zellkerne wurden durch 1 µg/ml DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 20 µm.

3.2.3 Caspase-8 akkumuliert in Nuklei arretierter Melanomzellen

Eine Beteiligung von Caspase-8 an der Zellzyklusprogression implizierte dessen nukleäre Lokalisation. Tatsächlich ließ sich eine Akkumulation von Caspase-8 oder einer Caspase-8-Proteindomäne in den Nuklei Zellzyklus-arretierter Melanomzellen dokumentieren (Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu war das Caspase-8-Protein unter normalen Kultivierungsbedingungen (Co) gleichmäßig über alle Kompartimente der Melanomzellen verteilt, was auf eine spezifische Akkumulation in Abhängigkeit vom Zellzyklusstatus schließen ließ.

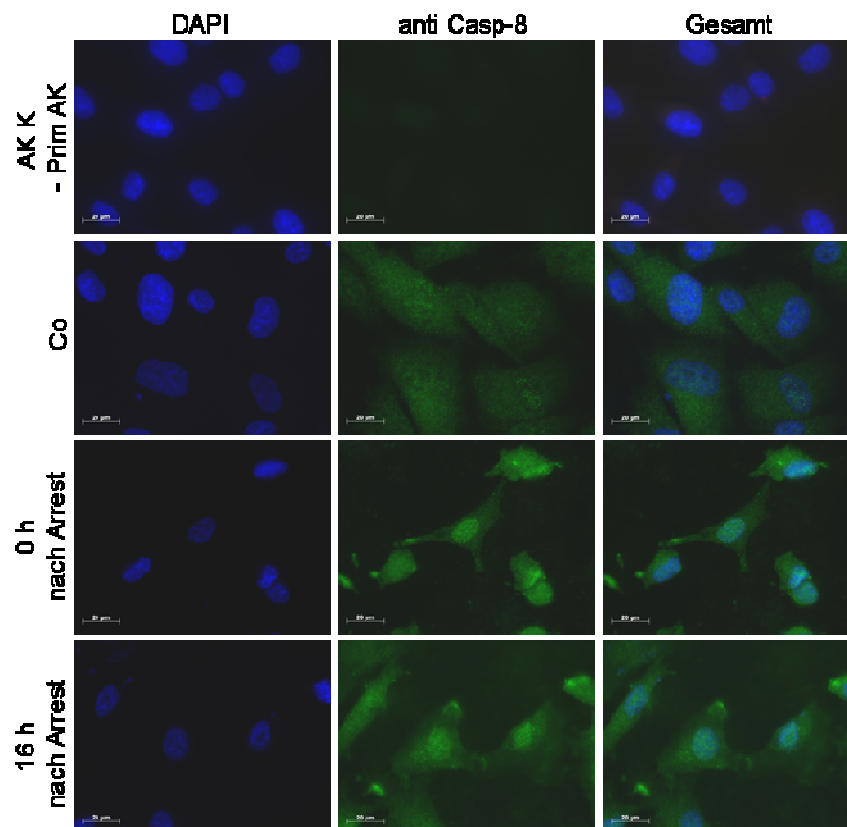


Abb. 3.19: Caspase-8 oder eine Caspase-8-Domäne akkumuliert bei Zellzyklus-Arrest im Nukleus. WM-115-Melanomzellen wurden synchronisiert und die Lokalisation endogener Caspase-8 unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen sowie 16 h nach Freilassung aus dem Arrest mittels IF-Mikroskopie untersucht. Die Färbung der Nuklei erfolgte durch DAPI (1 µg/ml). Co = *Control* (Kontrolle, hier: WM-115-Zellen unsynchronisiert); Maßstabsbalken: 20 µm.

Um zu untersuchen, ob das Caspase-8-Volllängenprotein oder lediglich eine Proteindomäne von Caspase-8 während des Zellzyklus-Arrest in den Nuklei akkumuliert, wurden verschiedene Caspase-8-Varianten (vgl. Abb. 2.3) ektopisch in den Melanomzellen exprimiert. Unter Zellzyklus-arretierten Bedingungen zeigte sich ausschließlich eine Akkumulation in Zellkernen nach ektopischer Expression der N-terminal *getaggten* wt-Caspase-8 oder der Prodomäne von Caspase-8. Im Gegensatz dazu ließ sich keine Akkumulation in Zellen nachvollziehen, die eine unspaltbare Variante des Caspase-8-Proteins (D/E) oder eine katalytisch inaktive Variante (C360A) exprimierten (Abb. 3.20). Dies deutete erstmals auf die Notwendigkeit einer proteolytischen Prozessierung als Voraussetzung für die Akkumulation in den Nuklei von Melanomzellen unter Zellzyklus-arretierten Bedingungen hin.

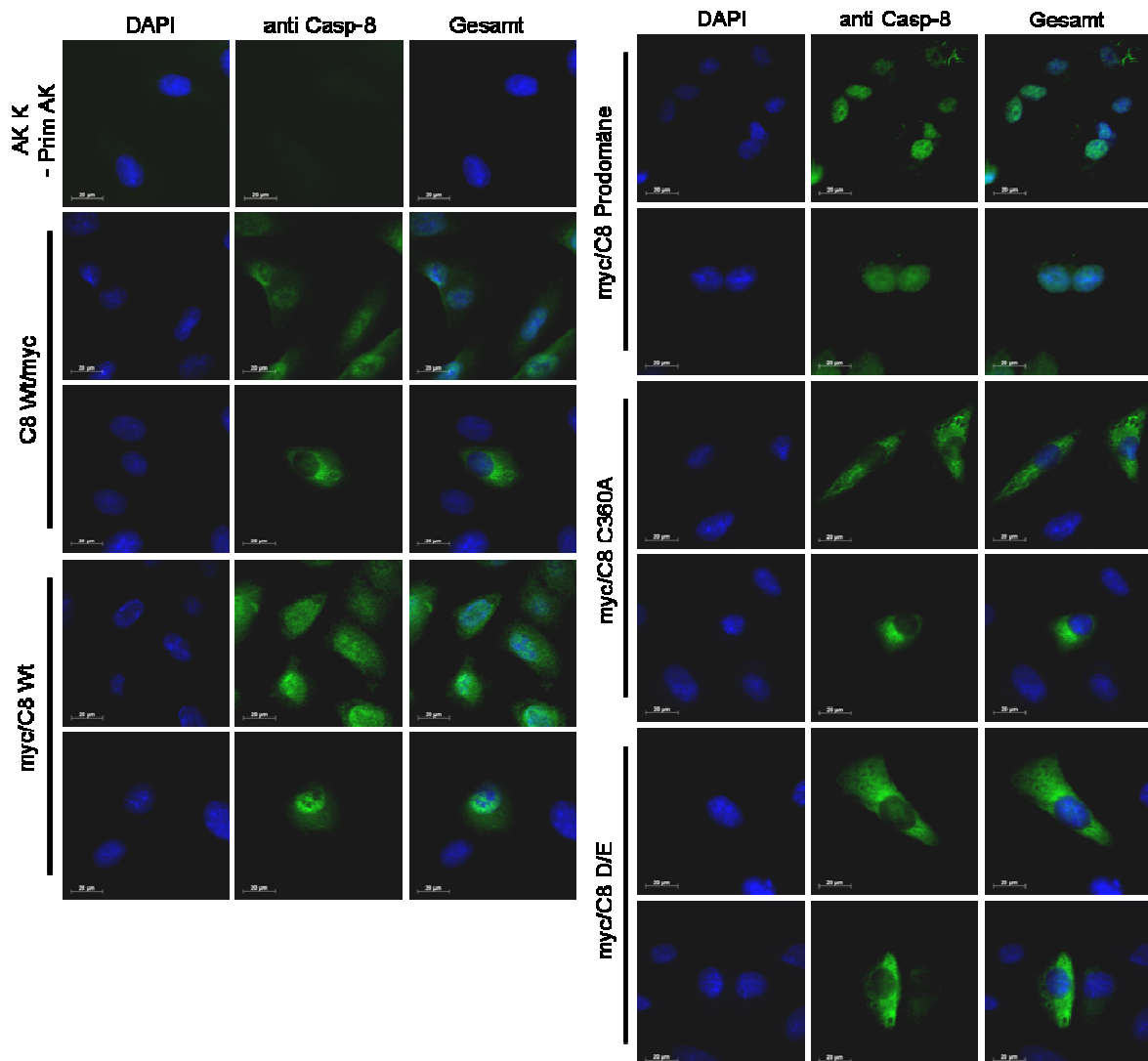


Abb. 3.20: Caspase-8 oder eine Caspase-8-Proteindomäne akkumuliert im Nukleus unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen. WM-115-Zellen wurden mit den angegebenen Caspase-8-Varianten transfiziert und deren Lokalisation während des S-Phase-Blocks über einen Caspase-8-spezifischen AK mittels IF-Mikroskopie nachgewiesen. Die Nuklei wurden durch DAPI-Färbung (1 µg/ml) visualisiert.

Casp-8 Wt/myc = Caspase-8 Wt/myc (myc-tag C-terminal); myc/Casp-8 Wt = myc/Caspase-8 Wt (myc-tag N-terminal); myc/Casp-8 Prodomäne = myc/Caspase-8 Prodomäne; myc/Casp-8 C360A = myc/Caspase-8 C360A (katalytisch inaktiv); myc/Casp-8 D/E = myc/Caspase-8 D/E (unspaltbar); Maßstabsbalken: 20 µm.

Auch eine Flag-getaggte Caspase-8-Prodomänen-Variante konnte angereichert in den Nuklei Zellzyklus-arretierter Melanomzellen, sowie 16 h nach Entlassung aus dem S-Phase-Arrest, detektiert werden (Abb. 3.21). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der zuvor beobachteten Akkumulation um einen artefiziellen Effekt des gekoppelten myc-tag handelte.

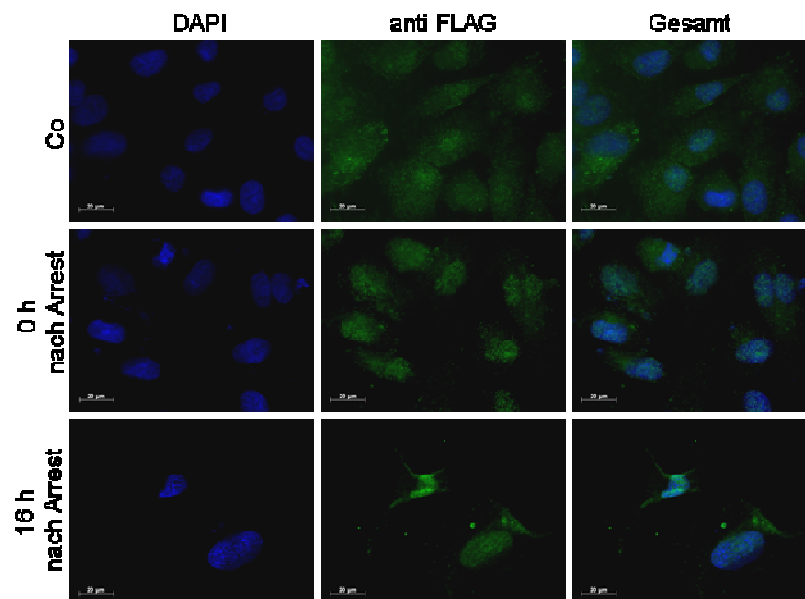


Abb. 3.21: Die Prodomäne von Caspase-8 akkumuliert im Nukleus von Melanomzellen unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen. WM-115-Zellen wurden mit Flag-*getaggtter* Prodomäne von Caspase-8 transfiziert und deren Lokalisation während des S-Phase-Blocks sowie 16 h nach Entlassung aus dem Arrest mittels IF-Mikroskopie detektiert. Die Zellkerne wurden durch 1 µg/ml DAPI angefärbt.

Maßstabsbalken: 20 µm.

3.2.4 Die Akkumulation der Caspase-8-Prodomäne ist abhängig von Zellzyklus

Die Akkumulation der Caspase-8-Prodomäne konnte eindeutig mit dem Status des Zellzyklus korreliert werden. Unter normalen Kultivierungsbedingungen verteilte sich Caspase-8 diffus über alle Kompartimente der Melanomzellen. Während des S-Phase-Arrests konnte jedoch wiederholt eine Akkumulation der N-terminalen Prodomäne von Caspase-8 in den Nuklei der Melanomzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Diese Akkumulation konnte in Zellen, welche die beiden funktionalen Caspase-8-Mutanten (D/E bzw. C360A) oder die C-terminal *getaggte* Caspase-8-Variante ektopisch exprimierten, nicht beobachtet werden. Interessanterweise konnte ebenfalls keine Akkumulation in den Zellkernen beobachtet werden, wenn eine Caspase-8-Variante ohne Prodomäne ektopisch exprimiert wurde (*myc/Casp-8 ΔProdomäne*), was dafür sprach, dass lediglich der N-terminale Prodomänenteil von Caspase-8 im Nukleus unter diesen Bedingungen akkumuliert. Die differenzielle Distribution der Prodomäne korrelierte weiterhin eindeutig mit dem Status des Zellzyklus, da ausschließlich unter Zellzyklus-arretierten Bedingungen eine Akkumulation dokumentiert werden konnte (Abb. 3.22).

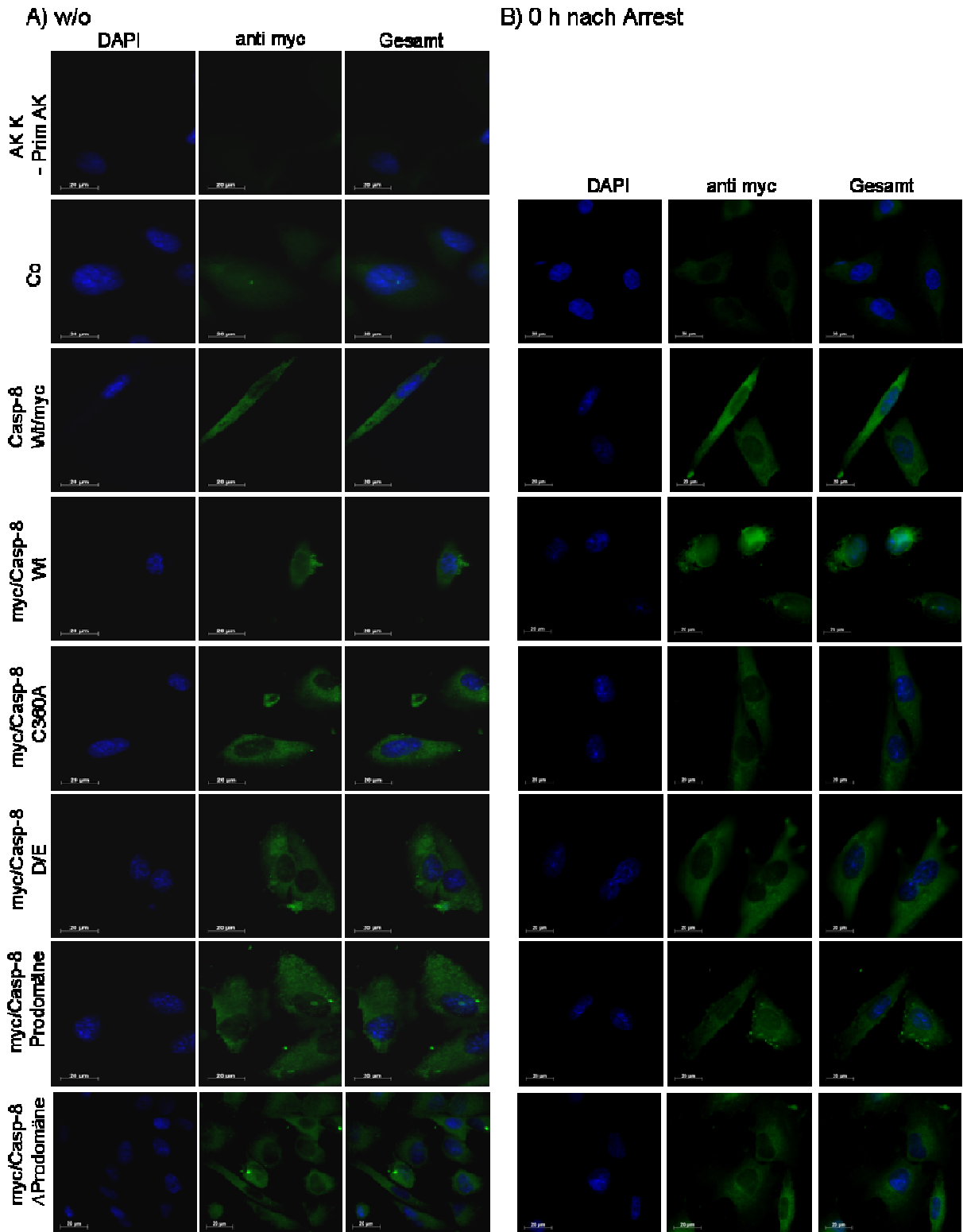


Abb. 3.22: Die Caspase-8-Prodomäne akkumuliert Zellzyklusabhängig im Nucleus. WM-115-Melanomzellen wurden mit den angegebenen Caspase-8-Varianten transfiziert und entweder die Lokalisation der Caspase-Konstrukte in **A)** unbehandelten Zellen oder **B)** während des S-Phase-Blocks (0 h nach Arrest) mittels IF-Mikroskopie dokumentiert. Dabei wurde ein gegen den gekoppelten myc-tag spezifischer Primär-AK eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit 1 μg/ml DAPI angefärbt.

Maßstabsbalken: 20 μm.

Auch biochemisch konnte eine differenzielle Distribution von Caspase-8 abhängig vom Zellzyklusstatus belegt werden. Unter normalen Kultivierungsbedingungen ließ sich das Caspase-8-Volllängenprotein sowohl im Zytoplasma, als auch in den nukleären Fraktionen der Melanomzellen im Western Blot detektieren (w/o, Abb. 3.23 **A**). 16 h nach Entlassung aus dem doppelten Thymidinblock jedoch, konnte das Volllängenprotein von Caspase-8 lediglich in den zytoplasmatischen Fraktionen von WM-115-Zellen nachgewiesen werden. Ausschließlich die Prodomäne von Caspase-8 befand sich unter diesen Bedingungen noch in den Nuklei (Abb. 3.23 **B**). Die biochemischen Analysen bestätigten somit die Ergebnisse der IF-Mikroskopie, in denen das Caspase-8-Volllängenprotein unter normalen Kultivierungsbedingungen diffus über die gesamten Zellen verteilt vorlag, es bei einem Zellzyklus-Arrest jedoch zur Akkumulation der N-terminalen Prodomäne von Caspase-8 in den Zellkernen kam.

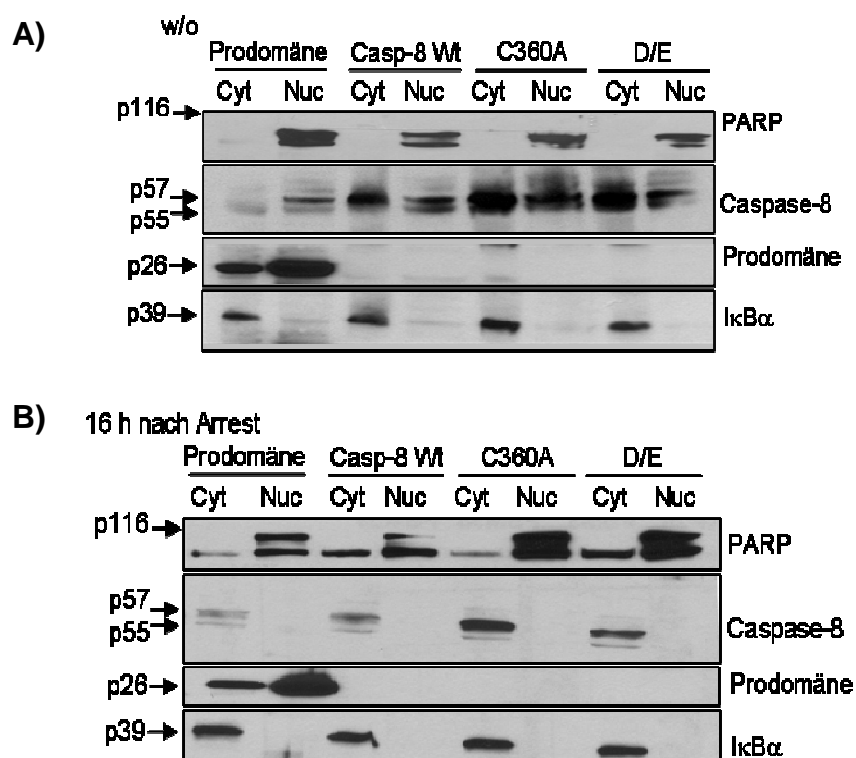


Abb. 3.23: Unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen befindet sich ausschließlich die Prodomäne von Caspase-8 im Zellkern. A + B) Die angegebenen Caspase-8-Varianten wurden ektopisch in WM-115-Zellen exprimiert und deren Lokalisation in zytoplasmatischen und nukleären Proteinfractionen in Western Blots nachgewiesen. Die Zellen in Ansatz **B)** wurden zusätzlich mit dem Doppel-Thymidinblock synchronisiert. Die Fraktionierung erfolgte 16 h nach Freilassung aus dem S-Phase-Arrest. PARP diente als Ladekontrolle für die nukleäre-, IκBα hingegen für die zytoplasmatische Fraktion.

w/o=without (hier: unbehandelt); Cyt = Zytoplasmatische Fraktion; Nuc = Nukleäre Fraktion; Prodomäne = myc/Caspase-8 Prodomäne; Casp-8 Wt = myc/Caspase-8 Wt; C360A = myc/Caspase-8 C360A (katalytisch inaktiv); D/E = myc/Caspase-8 D/E (unsplattbar)

3.2.5 Während der Metaphase sind die Nuklei frei von Caspase-8

In kürzlich geteilten Zellen hingegen konnte keinerlei Caspase-8 in den Zellkernen von WM-115-Melanomzellen detektiert werden (Abb. 3.24). Somit konnte von einer differenziellen Lokalisation der Caspase-8 im zytosolischem und nukleären Kompartiment abhängig vom Zellzyklusstatus ausgegangen werden.

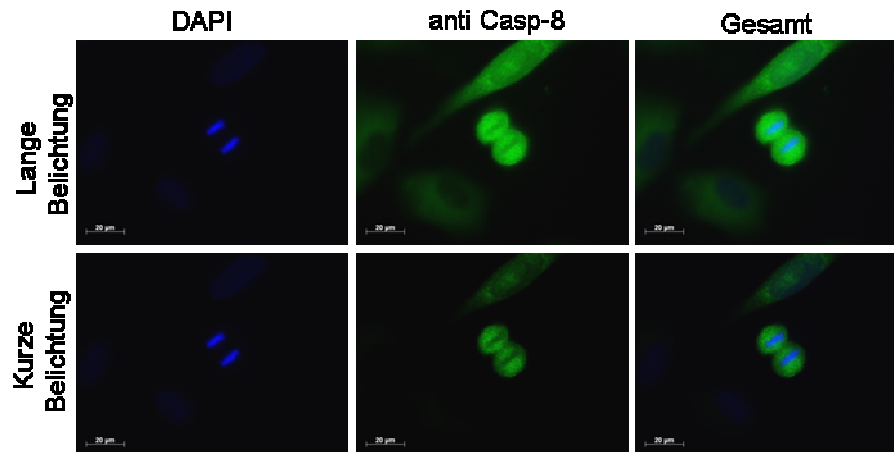


Abb. 3.24: Während der Metaphase befindet sich Caspase-8 nicht im Zellkern. Die Zellkerne un behandelter Melanomzellen wurden mit 1 µg/ml DAPI angefärbt und endogene Caspase-8 detektiert.

Maßstabsbalken: 20 µm.

3.2.6 Caspase-8 wird Zellzyklus-abhängig durch eine Caspase proteolytisch prozessiert

Da sich die Bedingung einer proteolytischen Prozessierung als Notwendigkeit zur Akkumulation in den Nuklei unter Zellzyklus-arretierten Bedingungen herauskristallisierte, wurden WM-115-Zellen mit einem Pan-Caspase-Inhibitor (QVD) behandelt. Die Inhibition der Caspasen verhinderte die zuvor beobachtete Akkumulation eines Caspase-8-Fragments in Melanomzellen vollständig (Abb. 3.25 **A**)), was auf eine Caspase-vermittelte Prozessierung unter Zellzyklus-arretierten Bedingungen hinwies. Wiederholt ließ sich keine Akkumulation in WM-115-Zellen dokumentieren, welche mit der C-terminal *getaggt* Variante von Caspase-8 transfiziert wurden, was die ausschließliche Anreicherung des N-Terminus von Caspase-8 reproduzierte (Abb. 3.25 **B**)).

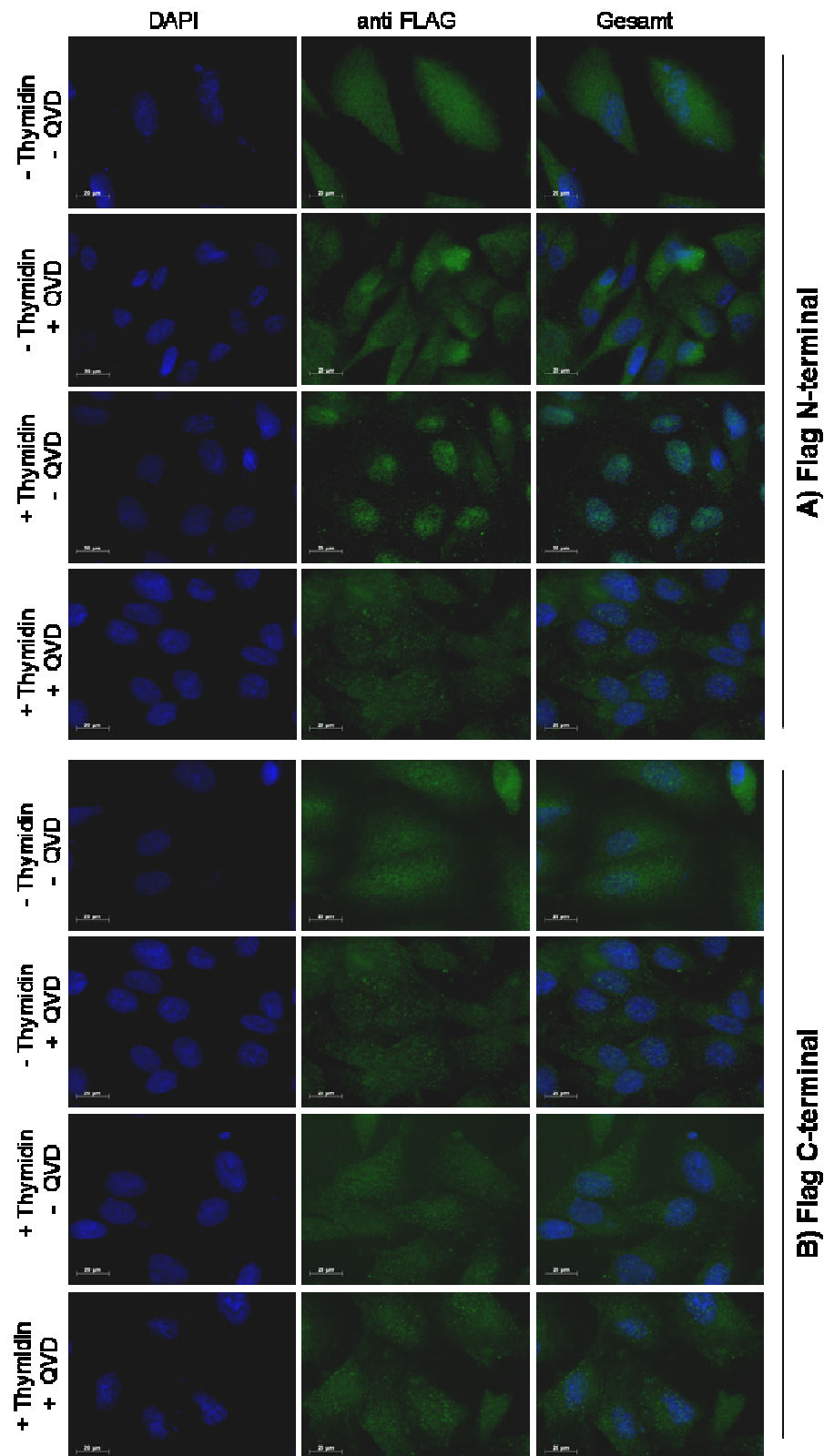


Abb. 3.25: Caspase-8 wird Zellzyklus-abhängig durch eine Caspase prozessiert, wobei ausschließlich die Prodomäne im Nucleus akkumuliert. WM-115-Zellen wurden mit **A)** N-terminal bzw. **B)** C-terminal Flag-getaggtter wt-Caspase-8 transfiziert. Die Akkumulation in den Nuclei wurde unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen (+ Thymidin) in An- und Abwesenheit von 20 µM QVD untersucht. Die Visualisierung der Nuclei erfolgte mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml). Maßstabsbalken: 20 µm.

3.2.7 Caspase-8 wird Zellzyklus-abhängig enzymatisch aktiviert

Da Caspase-8 als Initiator-Caspase die Kompetenz zur Autokatalyse besitzt (Chang et al., 2003; Boatright et al., 2003), wurde der Aktivitätsstatus dieser Protease Zellzyklus-abhängig analysiert. Tatsächlich ließ sich eine enzymatische Aktivierung von Caspase-8 während des S-Phase-Blocks, ebenso wie 16 h nach Entlassung aus dem Arrest nachweisen (Abb. 3.27). Dieses Ergebnis legte eine Prozessierung der Caspase-8 durch Autokatalyse unter Zellzyklus-arretierten Bedingungen nahe.

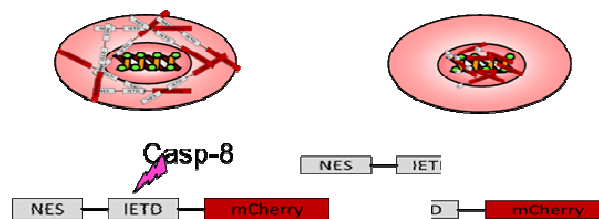


Abb. 3.26: Schematische Darstellung des mCherry-Konstruktes und seines Funktionsprinzips. Ein mCherry-Fluorochrom wird von einer NES (*nuclear export sequence*) durch eine Caspase-8-spezifische Spaltstelle (IETD) separiert. Aktive Caspase-8 entfernt die NES, wodurch der rote mCherry-Farbstoff im Nukleus akkumuliert.

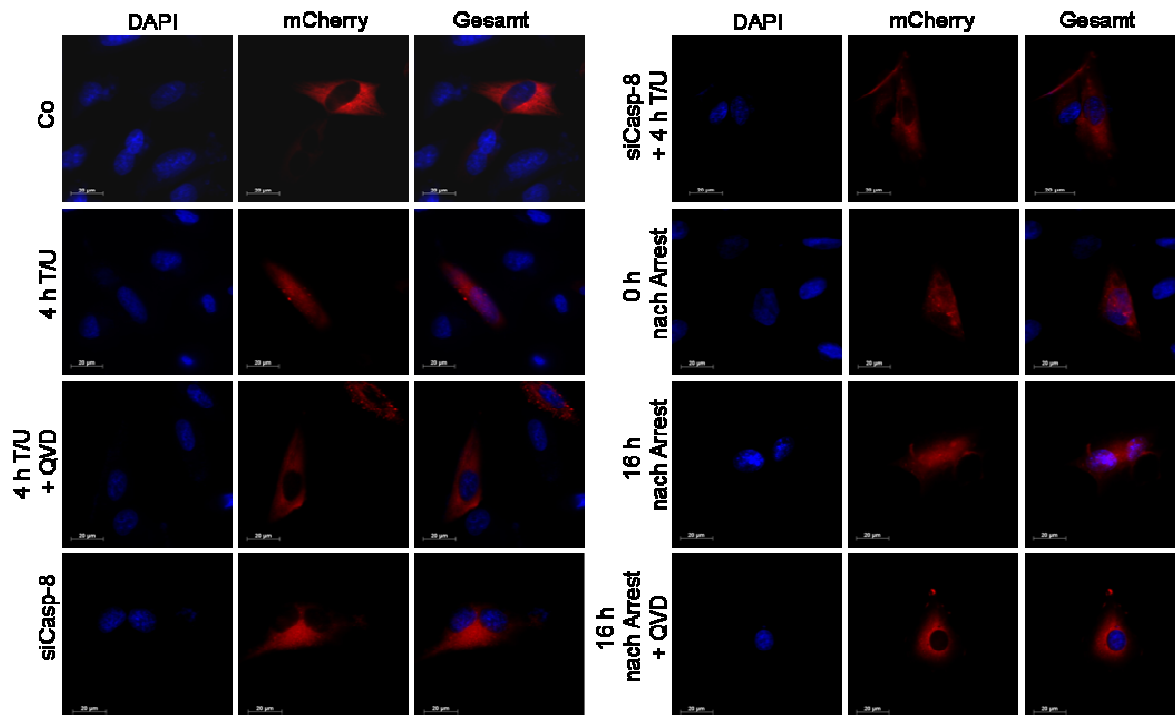


Abb. 3.27: Caspase-8 ist unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen katalytisch aktiv. WM-115-Melanomzellen wurden mit einem mCherry-Konstrukt transfiziert und synchronisiert. Die Lokalisation des mCherry-Fluorochroms wurde entweder während des S-Phase-Blocks (0 h nach Arrest) oder 16 h nach Entlassung aus dem S-Phase-Block am *Cell Observer* dokumentiert. Als Kontrolle der Spezifität dienten Caspase-8-depletierte Zellen sowie Zellen, welche für 4 h mit 100 ng/ml izTRAIL + 20 mJ/cm² UVB mit und ohne 20 µM QVD stimuliert wurden. Die Zellkerne wurden durch DAPI (1 µg/ml) angefärbt. Maßstäbsbalken: 20 µm.

3.2.8 Caspase-8-Präsenz ist für die Reparatur von DNA-Schaden notwendig

Die Caspase-8-Prodomäne ließ sich ausschließlich während der S-Phase des Zellzyklus in den Nuklei humaner Melanomzellen akkumuliert detektieren. Diese Zellzyklusphase wird vom Vorgang der DNA-Replikation zur Verdoppelung des Chromosomensatzes geprägt (Nishitani and Lygerou, 2002). Zur Gewährleistung einer korrekten DNA-Replikation spielen hierbei auch zahlreiche Kontrollinstanzen sowie DNA-Reparatur-Mechanismen eine bedeutende Rolle (Costas et al., 2011; Labib and De Piccoli, 2011). Die Bestrahlung mit einer sublethalen UVB-Dosis (20 mJ/cm^2) bestätigte die Notwendigkeit der Caspase-8-Präsenz zur Durchführung einer adequaten DNA-Reparatur, da Caspase-8-defiziente Melanomzellen im Vergleich zu Kontrollzellen keine Beseitigung des DNA-Schadens demonstrierten (Abb. 3.28).

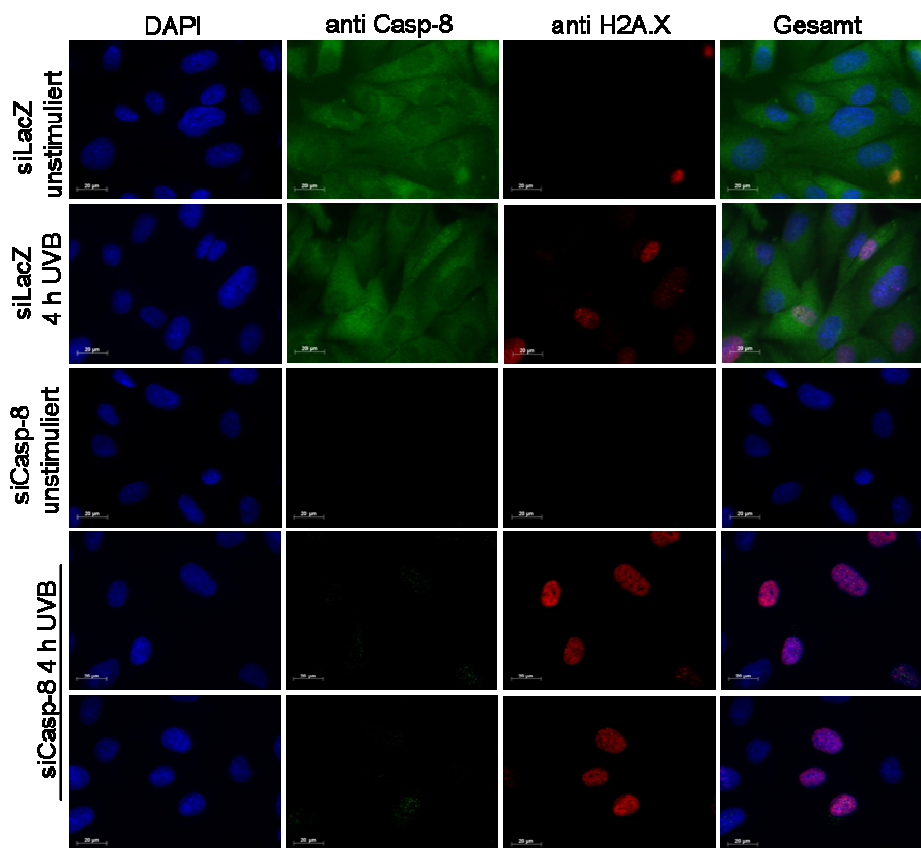


Abb. 3.28: Caspase-8-Defizienz verhindert eine adäquate Reparatur von DNA-Schaden. Caspase-8-depletierte WM-115-Zellen wurden für 4 h mit einer sublethalen UVB-Dosis (20 mJ/cm^2) bestrahlt. Das Ausmaß des DNA-Schadens wurde mit Hilfe eines spezifischen AK's detektiert und am *Cell Observer* über IF-Mikroskopie photographiert. Die Zellkerne wurden durch $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI visualisiert.

Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

Die Bestrahlung mit sublethalem UVB (20 mJ/cm^2) resultierte in Caspase-8-depletierten Melanomzellen zudem in der Induktion von Apoptose, da eine massive Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.29 **A**). Dies bestätigte den beobachteten apoptotischen Phänotyp als Konsequenz einer gestörten DNA-Reparatur während der S-Phase des Zellzyklus in Caspase-8-defizienten Melanomzellen. Die Aktivität der Caspase-9 war hierbei ebenfalls erhöht (Abb. 3.29 **B**), was auf die Induktion der Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg nahe legt.

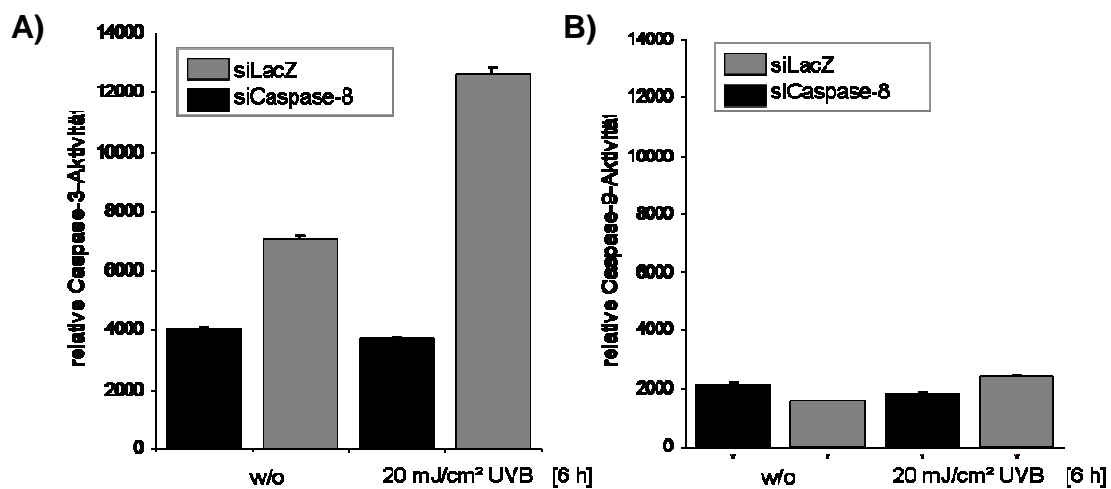


Abb. 3.29: Eine sublethale UVB-Dosis verstärkt den Apoptose-induzierenden Effekt der Caspase-8-Depletion. Caspase-8-depletierte Melanomzellen wurden mit einer sublethalen UVB-Dosis (20 mJ/cm^2) für 6 h stimuliert und die Aktivität der Caspasen-3 und -9 im Vergleich zu unbestrahlten WM-115-Zellen (w/o) bestimmt.

Abschließend kann folgendes Model postuliert werden: In humanen Melanomzellen kommt der Initiator-Caspase-8 mindestens noch eine weitere bedeutende Aufgabe zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase zu. Während der DNA-Synthesephase des Zellzyklus kommt es zur enzymatischen Aktivierung der Caspase-8. Die autokatalytisch prozessierte Prodomäne von Caspase-8 akkumuliert daraufhin in den Zellkernen, wo ihr eine bis dato noch unbekannte Funktion bei der Kontrolle und Reparatur während der DNA-Replikation und nach Einführung von DNA-Schaden zukommt. Kann diese aufgrund einer Caspase-8-Defizienz nicht adäquat erfolgen, wird der intrinsische mitochondriale Signalweg zur Ausführung des apoptotischen Programms induziert.

4 Diskussion

4.1 Caspase-3 spaltet XIAP in einem regulatorischen *feedback-loop* zur synergistischen Induktion von Apoptose

Der Todesligand TRAIL zählt zu den potentesten Induktoren von Apoptose in eukaryoten Zellen. Jedoch stellte sich während einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe heraus, dass die Mehrzahl von 18 untersuchten Melanomzelllinien resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sind (Thayaparasingham, 2009). Die Resistenz zeigte sich hierbei als unabhängig vom Tumorprogressionsstadium. Die simultane Bestrahlung mit einer per Definition sublethalen UVB-Dosis jedoch resultierte, ebenfalls unabhängig vom Tumorprogressionsstadium, in einer massiven Induktion von Apoptose initial TRAIL-resistenter Zelllinien, sowie einer synergistischen Verstärkung der Apoptose in zuvor leicht sensitiven Melanomzelllinien. Primäre Melanozyten blieben trotz Kostimulation jedoch Apoptoseresistent, was die grundsätzliche tumorselektive Eigenschaft des Todesliganden TRAIL bestätigt und ihn für die Melanomtherapie weiterhin interessant macht.

Biochemische Untersuchungen enthüllten die Interaktion zwischen XIAP und Caspase-3 als das entscheidende Kriterium für die TRAIL-Suszeptibilität humaner Melanomzellen. Für eine vollständige Aktivierung muss Caspase-3 in einem zweistufigen Prozessierungsmechanismus proteolytisch gespalten werden. Die zweite Prozessierungsspaltung kann dabei durch direkte Bindung des Inhibitors XIAP unterbunden werden (Riedl et al., 2001; Huang et al., 2001; Yu and Zhang, 2005), wodurch die enzymatische Aktivierung von Caspase-3 und somit die Exekution von Apoptose verhindert wird (Han et. al., 1997; Stennicke et al., 1998; Shi, 2002; Micheau and Mérimo, 2004). Für eine effektive Induktion von Apoptose ist daher die Eliminierung des Inhibitors XIAP essentiell. (Deveraux and Reed, 1999; Riedl et al., 2001; Salvesen and Duckett, 2002). Die Beseitigung des XIAP-Proteins kann mitunter durch eine NF- κ B-abhängige Repression der XIAP-Proteinexpression erreicht werden (Thayaparasingham, 2009). Dieser Repressionsmechanismus stellt allerdings eine eher längerfristige und verzögerte XIAP-Depletion dar, während die aktuellen Resultate auf eine sehr rasche und umfangreiche Eliminierung des XIAP-Volllängen-Proteins hinweisen.

Proteasomale Degradierung von XIAP über das 26S-Proteasom (Sohn et al., 2006; Yang, 2000b) schien hierbei eine Option zu sein. Jedoch scheinen sich auch hierbei die exakten molekularen Mechanismen zur Eliminierung Zellkontext- und Zelltypspezifisch stark zu unterscheiden. So wurden bislang eine Reihe unterschiedlicher Proteine für die proteasomale Degradierung XIAP's verantwortlich gemacht, darunter die PKC (Proteinkinase C) (Shi et al., 2005), Notch (Liu et al., 2007), Grim (Silke et al., 2004), Akt (Dan et al., 2004) cIAP1 und 2 (Silke et al., 2005; Cheung et al., 2008) sowie Survivin (Dohi et al., 2004). Der prominenteste Vertreter dieser Gruppe ist jedoch der mitochondriale pro-apoptotische Faktor Smac/Diablo (Liou et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass Smac/Diablo nach direkter Bindung an XIAP dessen Autoubiquitinierung initiiert und es so der Degradierung durch das Proteasom zuführt (Vucic et al., 2002; Fu et al., 2003). Hinzu kommen aktuell immer mehr Hinweise auf weitere regulatorische Vorgänge, die eine Eliminierung des XIAP-Proteins über weitere alternative Mechanismen vermuten lassen. So wurde bsw. eine potentielle Caspase-spezifische Spaltstelle in der XIAP-Proteinsequenz publiziert (Deveraux et al., 1999b). Eine Caspase-abhängige Spaltung von XIAP konnte bereits *in vivo* in HeLa-Zellen nach TRAIL und MG132-Behandlung sowie in Myelom-Zellen nach Gabe von Bortezomib nachgewiesen werden (Hougardy et al., 2006; Desplanques et al., 2009), jedoch blieb der zugrundeliegende molekulare Mechanismus bislang unaufgeklärt. Des Weiteren wurde die Auswirkung einer solchen XIAP-Spaltung auf den Verlauf der Apoptose bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch unterschiedlichste Methoden eindeutig belegt werden, dass eine Eliminierung des XIAP-Proteins ausschlaggebend für die UVB-vermittelte Sensitivierung initial TRAIL-resistenter Melanomzellen verantwortlich ist. Dabei konnte die Effektor-Caspase-3 als ausführende Protease der XIAP-Spaltung während der Induktion von Apoptose identifiziert werden. Diese Caspase-vermittelte proteolytische Spaltung von XIAP zeigte sich weiterhin als Voraussetzung für dessen proteasomale Degradierung durch das 26S-Proteasom. Eine Stimulation repräsentativ ausgewählter Melanomzellen mit sublethaler UVB-Bestrahlung induzierte keine Apoptose. Alleinige TRAIL-Stimulation resultierte lediglich in einer partiellen Caspase-3-Prozessierung in das katalytisch inaktive p21-Intermediat, da der zweite finale Prozessierungsspaltung durch direkte Inhibition von

XIAP unterbunden wird. Nach Kostimulation der Zellen mit izTRAIL in Kombination mit UVB kam es jedoch zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, so dass pro-apoptotische Faktoren wie Smac/Diablo und Cytochrom C in das Zytoplasma freigesetzt wurden. Freigesetztes Cytochrom C führte zusätzlich zur Formation der Caspase-9-Aktivierungsplattform (Apoptosom) (Shi, 2006). Allerdings weißt XIAP auch für diese Caspase eine sehr hohe Affinität auf und inhibiert dessen Aktivierung durch direkte Bindung sehr effektiv (Shiozaki et al., 2003). Eine direkte Bindung von Smac/Diablo an XIAP antagonisierte jedoch dessen anti-apoptotische Wirkung auf Caspase-3, wodurch diese in ihr enzymatisch aktives p17-Fragment prozessiert und somit vollständig aktiviert werden konnte. Vollständig aktivierte Caspase-3 spaltete daraufhin das XIAP-Protein in einer positiven regulatorischen *feedback*-Schleife, was zum Einen dessen inhibitorische Wirkung auf Caspase-9 durchbrach und zum Anderen dessen proteasomale Degradierung initiierte. Zudem existiert ein positiver *feedback*-loop zwischen den einzelnen apoptotischen Caspasen. So konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 durch direkte Spaltung von Caspase-9 dessen katalytische Aktivität massiv erhöht (Denault et al., 2007; Twiddy and Cain, 2007), sowie sein IAP-Bindungs-Motif entfernt (Zou et al., 2003). Ein bekanntes Substrat der Caspase-9 wiederum ist Caspase-3 (Zimmermann et al., 2001; Riedl and Salvesen, 2007), wodurch diese zusätzlich proteolytisch prozessiert wird. Eine effektive regulatorische Amplifikations-Schleife entsteht, so dass die massive Aktivierung der Effektor-Caspase-3 zur Exekution von Apoptose führt. Bedeutenderweise konnte derselbe positive regulatorische *feedback*-Mechanismus ebenfalls durch Behandlung humaner Melanomzellen mit izTRAIL in Kombination mit Cisplatin induziert werden, was eine breitgefächerte Anwendbarkeit auch in Hinsicht auf klinische Therapien impliziert.

4.1.1 Zusammenfassung

Der molekulare Mechanismus zur Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose kann auf einen regulatorischen *feedback-loop* zurückgeführt werden. Nach Bindung des Todesliganden TRAIL führt die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 lediglich zu einer partiellen Prozessierung der Effektor-Caspase-3 in sein katalytisch inaktives p21-Intermediat. Der finale Prozessierungsschritt in das katalytisch aktive p17-Fragment wird durch direkte Assoziation von

XIAP unterbunden. Die gleichzeitige Einführung von DNA-Schaden führt jedoch zur Zuschaltung des intrinsischen mitochondrialen Signalwegs. Die dadurch zusätzlich freigesetzten pro-apoptotischen Faktoren Smac/Diablo sowie Cytochrom C ermöglichen eine vollständige Prozessierung von Caspase-3 nach Aktivierung des extrinsischen Rezeptor-vermittelten Signalwegs. Smac/Diablo antagonisiert die inhibitorische Wirkung von XIAP, wobei die simultane Cytochrom C-Freisetzung eine Aktivierung der Initiator-Caspase-9 durch Formation des Apoptosoms ermöglicht, was in einer zusätzlichen Prozessierung der Caspase-3 resultiert. Vollständig aktivierte Caspase-3 spaltet daraufhin das XIAP-Protein in einer regulatorischen *feedback*-Schleife und initiiert somit dessen proteasomalen Degradierung. Die Apoptose wird exekutiert.

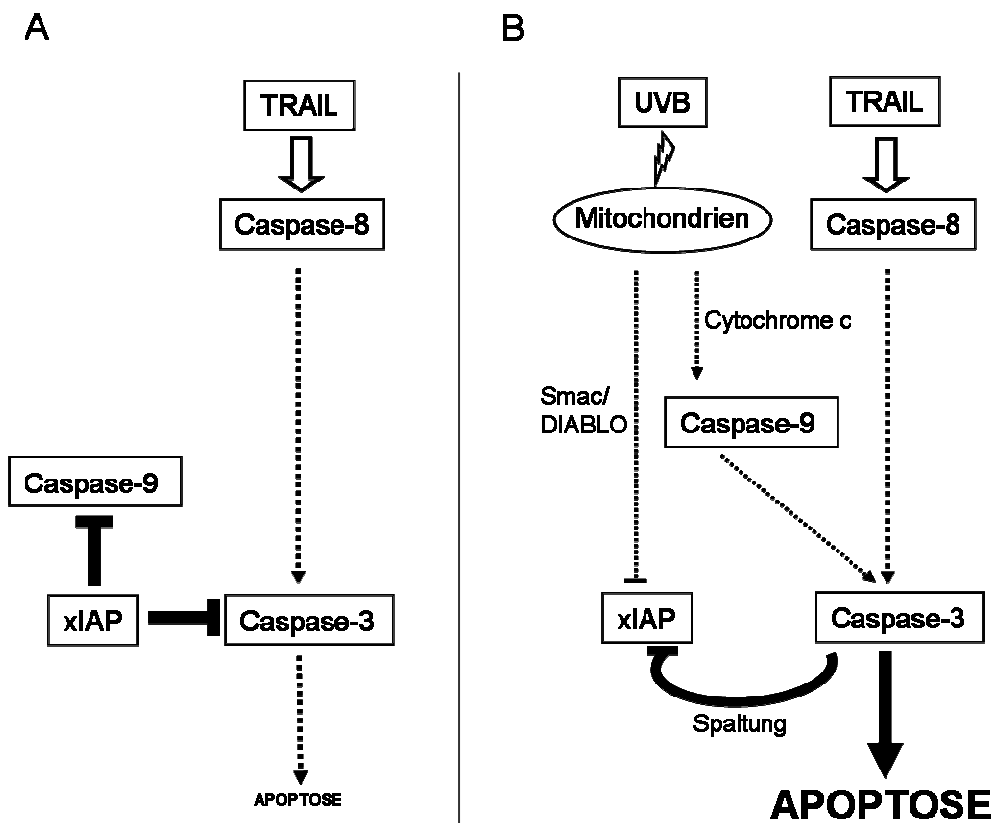


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der UVB-vermittelten Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose. A) Eine Aktivierung von Caspase-8 nach TRAIL-Bindung an den Todesrezeptor führt lediglich zu einer moderaten Induktion von Apoptose, da XIAP die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 sowie die finale Prozessierung von Caspase-3 effektiv inhibiert. **B)** Eine Kostimulation mit sublethaler UVB-Bestrahlung jedoch involviert den intrinsischen Signalweg, wodurch pro-apoptotische Faktoren aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Die zusätzliche Aktivierung von Caspase-9 sowie die Antagonisierung von XIAP durch Smac/Diablo erlauben eine vollständige Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Diese spaltet daraufhin XIAP in einem positiven regulatorischen *feedback-loop* und initiiert somit dessen proteasomale Degradierung, wodurch das apoptotische Programm ausgeführt werden kann.

4.2 Weitere Funktion der Caspase-8

Ein *knock down* des Caspase-8-Proteins in humanen Melanomzellen resultierte in morphologischen Auffälligkeiten, die charakteristische Merkmale von Apoptose aufwiesen. Exemplarisch wurden diese morphologischen Veränderungen in WM-115-Zellen dokumentiert und beinhalteten den Verlust von Adhärenz, Zellschrumpfen und Abschnüren von Membranvesikeln. Eine Analyse des Zellzyklus Caspase-8-defizienter Melanomzellen enthüllte daraufhin ein verändertes Phasenprofil. Es zeigte sich eine Umverteilung der klassischen Zyklusphasen zu Lasten der Metaphase (G2/M), welche mit einer massiven Induktion von Apoptose einherging.

Allererste Hinweise auf eine potentiell überlebensnotwendige Funktion von Caspase-8 ergaben sich durch die Beobachtung, dass sich in Mäusen ein Caspase-8 *knock out* am Tag 11.E der Gestation als embryolethal erweist (Varfolomeev et al., 1998). Eine ausführliche Studie beschrieb in diesem Zusammenhang, dass dieser embryonale Effekt der Caspase-8-Deletion in Mäusen durch simultanen RIPK1- (*Receptor Interacting Protein Kinase 1*) *knock out* vollständig revertiert werden konnte. Dabei wird von einer konstitutiven Inhibition des nekroptotischen Zelltods durch direkte Caspase-8-vermittelte Spaltung der RIPK1 ausgegangen (Kaiser et al., 2011; Oberst et al., 2011a). Auch in einigen weiteren Studien wurde die elementare Bedeutung der Caspase-8 zur Unterdrückung des nekroptotischen Zelltods postuliert (Lin et al., 2000; Feng et al., 2007; Oberst et al., 2011b). Eine Rolle bei der Unterdrückung von Autophagie wurde für Caspase-8 ebenfalls bereits mehrfach diskutiert. In T-Zellen bsw. scheint Caspase-8 im Komplex mit FADD für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase notwendig zu sein, indem es ebenfalls durch direkte Spaltung von RIPK1 kontinuierlich die Induktion von Zelltod in hyperautophagischen Zellen unterbindet (Yu et al., 2004; Bell et al., 2008). Alternativ wurde eine direkte Spaltung der Deubiquitinase Cylindromatosis durch Caspase-8 vorgeschlagen. Konstitutiv ubiquitinierte RIPK1 verbleibt am Komplex I und kann somit keine Nekroptose induzieren (Wang et al., 2008; Enesa et al., 2008; Gerlach et al., 2011).

Ausgehend von diesen Hinweisen aus der Fachliteratur, wurde der Einfluss von RIPK1 auf den beobachteten Phänotypen in humanen Melanomzellen untersucht. Dabei bewahrte eine simultane Depletion von RIPK1 oder der *downstream* liegenden

RIPK3 die in dieser Arbeit untersuchten Caspase-8-defizienten Melanomzellen jedoch nicht vor dem Zelltod. Auch eine chemische Inhibition dieser Kinase mit Nekrostatin resultierte nicht in der Unterdrückung der morphologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt), wodurch eine Induktion dieser alternativen Todessignalwege als ursächlich für den beobachteten Phänotyp nach Caspase-8-Depletion ausgeschlossen werden konnten.

Auch die Fähigkeit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde Caspase-8 nachgewiesen, wodurch seine überlebensnotwendige Funktion erklärt werden könnte. NF- κ B gilt als einer der wichtigsten anti-apoptotischen Faktoren, da er abhängig von zellulären Kontext die Expression bedeutender anti-apoptotischer Proteine transaktivieren kann (Karin, 2002; Bonizzi and Karin, 2004). So könnte Caspase-8 als Gerüstprotein die Bildung eines NF- κ B-aktivierenden Komplexes ermöglichen, indem es IKK- (I κ B α Kinase Komplex) Proteine mittels seiner Prodomäne und TRAF2 (*TNF receptor-associated factor2*), RIPK1 sowie NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) über seine katalytischen Proteindomänen rekrutiert (Chaudhary et al., 2000). In B-Lymphozyten, NK- (*natural killer*) Zellen, sowie hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde ebenfalls die Beteiligung von Caspase-8 am NF- κ B-Signalweg nachgewiesen. Eine direkte Caspase-8-vermittelte Spaltung von FLIP zu FLIP₄₃ resultierte über Rekrutierung von RIPK1 und TRAF2 in einer Aktivierung von NF- κ B (Lens et al., 2002; Micheau et al., 2002; Algeciras-Schimnich et al., 2002; Launay et al., 2005). Sogar eine direkte Spaltung des I κ B α (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) durch Caspase-8 wurde in HEK293- und HeLa-Zellen nach TRAIL-Stimulation gezeigt (Rathore et al., 2004). Die Aktivierung von NF- κ B über den JNK- (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 MAPK- (*p38 mitogen-activated protein kinase*) Weg durch Caspase-8 wurde bereits ebenfalls publiziert (Varfolomeev et al., 2005).

In einer ausführlichen Untersuchung NF- κ B-Signalwegs-assoziiierter Proteine konnte in Caspase-8-defizienten Melanomzellen jedoch keinerlei differenzielle Regulierung nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte kein modifizierter NF- κ B-Aktivierungsstatus nach Caspase-8-Depletion belegt werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die überlebensnotwendige Funktion von Caspase-8 in Melanomzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B realisiert wird.

Caspase-8 soll des Weiteren eine bedeutende Rolle bei der Initiation des ERK1/2- (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) Signalweges sowie für die p38 MAPK- (*p38 mitogen-activated protein kinase*) Aktivität zukommen. Dabei wurde nachgewiesen, dass MAPK's in vielen verschiedenen Zelltypen wichtig für das Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration sowie Modulation von Apoptose-Signalwegen sind (Helfer et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Peter et al., 2007; Nakajima et al., 2008). Allerdings konnte auch dieser Mechanismus für das humane Melanomsystem ausgeschlossen werden, da keinerlei differenzielle Regulierung von ERK1/2 abhängig vom Caspase-8-Status nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise resultiert im Mausmodell ein *knock out* von FLIP_L in einem ähnlichen, embryolethalen Phänotyp wie die Depletion von Caspase-8 (Maelfait and Beyaert, 2008; Oberst et al., 2011a; Declercq et al., 2011; Oberst and Green, 2011). Dabei könnte FLIP sowohl aktiv durch Promotion der NF- κ B-Aktivierung, als auch durch Modulation der Caspase-8-Aktivität seine überlebensnotwendige Funktion ausüben. Jedoch resultierte eine experimentelle Depletion des FLIP-Proteins mittels RNA-Interferenz in WM-115-Zellen nicht in einem analogen apoptotischen Phänotyp, weshalb auch dieser Mechanismus für die untersuchten humanen Melanomzellen nicht in Betracht gezogen wurde.

Eine Beteiligung von Caspase-8 an der Progression des Zellzyklus wurde für primäre Hepatozyten (Gilot et al., 2005) sowie für T-Zellen vermutet (Arechiga et al., 2007). Interessanterweise wurde dabei eine Korrelation zwischen experimenteller Herunterregulierung der Caspase-8-Proteinkonzentration mit einem Rückgang der DNA-Replikation festgestellt sowie ein Zellzyklus-Arrest während der G1-Phase des Zellzyklus dokumentiert (Gilot et al., 2005). Die Erstellung eines Zellzyklusprofils der untersuchten Melanomzellen enthüllte tatsächlich einen Zellzyklusarrest innerhalb der S-Phase sowie einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen nach Caspase-8-Depletion. Des Weiteren konnte Caspase-8 eindeutig in den Nuklei humaner Melanomzellen während des Zellzyklusarrests nachgewiesen werden. Dazu passend wurde die Präsenz von Caspase-8 auch in anderen Zelllinien in den Zellkernen belegt (Besnault-Mascard et al., 2005; Yao et al., 2007; Mielgo et al., 2009). In den untersuchten humanen Melanomzellen konnte dabei die Akkumulation der Caspase-8 im Zellkern mit dem Status des Zellzyklus korreliert werden. Caspase-8

ließ sich ausschließlich während der S-Phase des Zellzyklus und nicht während der Mitose-Phase akkumuliert im Zellkern detektieren. In der Fachliteratur war zudem die ausschließliche Präsenz eines N-terminalen Caspase-Fragments (DEDa) im Zellkern beschrieben worden, welches durch Autokatalyse generiert wurde (Yao et al., 2007). In epithelialen, endothelialen und myeloiden Zellen wurde zudem eine Akkumulation der Caspase-8-Prodomäne abhängig vom Zellzyklus-Status dokumentiert (Mielgo et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe unterschiedlich fusionierter *tags* ebenfalls eine ausschließliche Akkumulation des N-terminalen Fragments (Prodomäne) von Caspase-8 in humanen Melanomzellen bestätigt werden. Durch intensive Studien konnte weiterhin belegt werden, dass Caspase-8 durch eine Caspase-vermittelte Spaltung während der S-Phase des Zellzyklus prozessiert wird, was zur Freisetzung der N-terminalen Prodomäne führte. Bedeutenderweise konnte zudem die katalytische Aktivierung von Caspase-8 in Abhängigkeit von Status des Zellzyklus nachgewiesen werden. Da Caspase-8 als Initiator-Caspase die Fähigkeit zur Autokatalyse besitzt, deuten diese Hinweise auf eine autokatalytische Prozessierung der Caspase-8 zur Generierung der freien Prodomäne hin. Ausschließlich diese akkumulierte daraufhin während der S-Phase des Zellzyklus in den Nuklei von Melanomzellen, wobei das Schicksal der verbleibenden C-terminalen Domäne ungeklärt bleibt.

Da die S-Phase des Zellzyklus vorrangig durch den Vorgang der DNA-Replikation geprägt ist (Nishitani and Lygerou, 2002), wurde eine Beteiligung der Caspase-8 während dieses essentiellen Prozesses vermutet. Während der Verdopplung der Chromosomensätze kommen zahlreiche Reparatur- und Kontrollmechanismen zum Einsatz, um eine korrekte Replikation der DNA-Sequenz zu gewährleisten (Costas et al., 2011; Labib and De Piccoli, 2011). Eine simultane Bestrahlung mit einer per sé sublethalen UVB-Dosis bestätigte den Verdacht der Beteiligung von Caspase-8 an diesem Vorgang, da in Caspase-8-defizienten Melanomzellen eine insuffiziente DNA-Reparatur nachgewiesen werden konnte. Als Konsequenz konnte des Weiteren die Induktion von Apoptose durch eine massive Aktivierung von Caspase-3 und -9 nach UVB-Bestrahlung in Caspase-8-defizienten Melanomzellen belegt werden. Eine insuffiziente DNA-Reparatur führt zur Induktion des intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Signalwegs (Wang et al., 2001; Yu and Zhang, 2005). Über den Transkriptionsfaktor p53 wird die Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine

aufreguliert, was in mitochondrialer Dysfunktion und letztendlich in der Aktivierung der Caspasen-9 und -3 resultiert (Moll and Schramm, 1998; Fridman and Lowe, 2003). Im Einklang mit diesen wissenschaftlichen Erkenntnissen sprechen die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit für die Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalwegs als Konsequenz einer mangelhaften DNA-Reparatur nach Depletion der Caspase-8 in humanen Melanomzellen. Während der DNA-Replikation resultiert dies vorerst in einem Arrest innerhalb der Synthesephase des Zellzyklus, um entsprechende Reparaturmechanismen zu aktivieren. Letztendlich wird jedoch auch hier das apoptotische Programm über den intrinsischen Signalweg induziert, wenn diese aufgrund fehlender Caspase-8 nicht adäquat ausgeführt werden können.

4.2.1 Zusammenfassung

Zusammengefasst kann folgendes Model postuliert werden: Unter normalen Bedingungen liegt Caspase-8 diffus in allen Kompartimenten von Melanomzellen lokalisiert vor. Als Initiator-Caspase kommt Caspase-8 eine fundamentale Bedeutung als Initiator der Rezeptor-vermittelten Apoptose zu, nach dessen Aktivierung Caspase-8 sowohl den extrinsischen, als auch den intrinsischen Signalweg durch direkte Spaltung von Bid und Caspase-3 transduziert. Abhängig von Status des Zellzyklus jedoch, wird Caspase-8 bei Eintritt in die S-Phase katalytisch aktiviert und prozessiert sich daraufhin autokatalytisch. Die freigesetzte N-terminale Prodomäne von Caspase-8 akkumuliert in den Nuklei. Wird Caspase-8 depletiert, kann es zu keiner adäquaten Reparatur von DNA-Schaden kommen und Apoptose wird, vermutlich über intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg, induziert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der Aufbau der Haut.	- 3 -
Abb. 1.2: Die Progression eines malignen Melanoms mit Verlauf durch die einzelnen Phasen.....	- 7 -
Abb. 1.4: Die Proteinfamilie der Caspasen.....	- 9 -
Abb. 1.5: Jeweils die funktionalen α - und β -UE´s zweier Caspasmoleküle bilden nach Spaltung ein katalytisch aktives Heterotetramer.	- 10 -
Abb. 1.6: Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose.....	- 13 -
Abb. 1.7: TRAIL und seine Rezeptoren.....	- 14 -
Abb. 1.8: Schematische Darstellung der konservierten IAP-Proteindomänen.....	- 16 -
Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Interaktion von XIAP mit Caspasen bzw. Smac/Diablo.....	- 17 -
Abb. 1.10: XIAP verhindert durch direkte Bindung den aktivierenden Prozessierungsschritt von Caspase-3.	- 17 -
Abb. 1.11: Übersichtsschaubild von Caspase-8-Funktionen.	- 19 -
Abb. 2.1: Das Prinzip der Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti.	- 42 -
Abb. 2.2: Schematische Darstellung klonierter XIAP-Konstrukte für die Untersuchung der UVB-vermittelten Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose.	- 45 -
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der für die Untersuchung alternativer Caspase-8-Funktionen in humanen Melanomzellen klonierter Caspase-8-Varianten mit <i>myc-tag</i>	- 46 -
Abb. 2.4: Schematische Darstellung der für die Untersuchung alternativer Caspase-8-Funktionen in humanen Melanomzellen klonierter Caspase-8-Varianten mit <i>Flag-tag</i>	- 46 -
Abb. 3.1: UVB vermittelt die Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose.	- 52 -
Abb. 3.2: Die UVB-vermittelte Sensitivierung humaner Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose korreliert mit einer vollständigen Caspase-3-Prozessierung sowie XIAP-Depletion.	- 53 -
Abb. 3.3: Die Depletion von XIAP erfolgt über ein trunkiertes Intermediat.	- 54 -
Abb. 3.4: Die Spaltung von XIAP ist Caspase-abhängig.	- 55 -

Abb. 3.5: Die Inhibition von Caspase-9 hat den geringsten Einfluss auf die Apoptoserate.....	- 55 -
Abb. 3.6: XIAP wird hinter Asp-242 Caspase-abhängig gespalten.....	- 56 -
Abb. 3.7: Die unspaltbare XIAP-Mutante (D242E) inhibiert Apoptose effektiver als wt-XIAP.....	- 56 -
Abb. 3.8: Ein XIAP- <i>knock down</i> ermöglicht eine vollständige Caspase-3-Prozessierung.	- 57 -
Abb. 3.9: Die unspaltbare XIAP-Variante inhibiert Caspase-3 am stärksten.	- 58 -
Abb. 3.10: Während der Exekution von Apoptose wird XIAP durch Caspase-3 gespalten.	- 59 -
Abb. 3.11: In WM-115-Zellen wird Apoptose 4 - 6 h nach TRAIL-UVB-Kostimulation induziert und geht mit mitochondrialer Dysfunktion einher.....	- 61 -
Abb. 3.12: Smac/Diablo erleichtert eine vollständige Caspase-3-Prozessierung mit simultaner XIAP-Depletion und trägt zur synergistischen Induktion von Apoptose bei.	- 62 -
Abb. 3.13: Smac/Diablo ist nicht alleine für die synergistische Induktion von Apoptose in Melanomzellen nach Kostimulation verantwortlich.....	- 63 -
Abb. 3.14: Cisplatin sensitiviert humane Melanomzellen ebenfalls für die TRAIL-induzierte Apoptose.	- 64 -
Abb.3.15: In Melanomzellen resultiert ein <i>knock down</i> von Caspase-8 in der Ausbildung eines apoptotischen Phänotypen, der nur partiell durch Caspase-Inhibition revertierbar ist.....	- 66 -
Abb. 3.16: Eine Depletion von Caspase-8 verändert das Zellzyklusprofil und resultiert in einer erhöhten Apoptoserate.....	- 67 -
Abb. 3.17: Caspase-8-defiziente Melanomzellen arretieren in der S-Phase des Zellzyklus.	- 67 -
Abb. 3.18: Caspase-8-depletierte Melanomzellen transitieren nicht in die G2/M-Phase des Zellzyklus.	- 68 -
Abb. 3.19: Caspase-8 oder eine Caspase-8-Domäne akkumuliert bei Zellzyklus-Arrest im Nukleus.....	- 69 -
Abb. 3.20: Caspase-8 oder eine Caspase-8-Proteindomäne akkumuliert im Nukleus unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen.....	- 70 -

Abb. 3.21: Die Prodomäne von Caspase-8 akkumuliert im Nukleus von
Melanomzellen unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen..... - 71 -

Abb. 3.22: Die Caspase-8-Prodomäne akkumuliert Zellzyklusabhängig im Nukleus. ...
..... - 72 -

Abb. 3.23: Unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen befindet sich ausschließlich
die Prodomäne von Caspase-8 im Zellkern. - 73 -

Abb. 3.24: Während der Mitose befindet sich Caspase-8 nicht im Zellkern. - 74 -

Abb. 3.25: Caspase-8 wird Zellzyklus-abhängig durch eine Caspase prozessiert,
wobei ausschließlich die Prodomäne im Nukleus akkumuliert. - 75 -

Abb. 3.26: Schematische Darstellung des mCherry-Konstruktes und seines
Funktionsprinzips. - 76 -

Abb. 3.27: Caspase-8 ist unter Zellzyklus-arretierenden Bedingungen katalytisch
aktiv. - 76 -

Abb. 3.28: Caspase-8-Defizienz verhindert eine adäquate Reparatur von DNA-
Schaden..... - 77 -

Abb. 3.29: Eine sublethale UVB-Dosis verstärkt den Apoptose-induzierenden Effekt
der Caspase-8-Depletion.. - 78 -

Abb. 4.1: Schematische Darstellung der UVB-vermittelten Sensitivierung humaner
Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose.. - 82 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Für die DNA-Elektrophorese und SDS-PAGE eingesetzten Größenmarker.....	- 23 -
Tab. 2.2: Zur Amplifikation und Mutagenese mittels PCR verwendete Primer.....	- 30 -
Tab. 2.3: Für den transienten <i>knockdown</i> eingesetzte siRNA´s.....	- 31 -
Tab. 2.4: Ausgesäte Zellzahlen verwendeter Zelllinien zur Stimulation bzw. Transfektion.....	- 35 -
Tab. 2.5: Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzte AK.....	- 44 -
Tab. 2.6: Zusammensetzung des Mutagenese-Ansatzes zur Einführung von Mutationen.....	- 47 -
Tab. 2.7: Verwendetes Temperaturprogramm bei der Mutagenese nach <i>Stratagene</i>	- 47 -

Literaturverzeichnis

- Acosta, A., Bais, B., (2002). Global Solar UV Index. *World Health Organization*.
- Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., and Peter, M. E., (2002). Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Current opinion in cell biology*, 14 (6), 721-726.
- Altucci, L., and Gronemeyer, H., (2004). Retinoids and TRAIL: Two Cooperating Actors to Fight Against Cancer. *Academic Press*, Vol. 67, 319-345.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.-C., (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*, 15, 345, 271-278.
- Arechiga, A. F., Bell, B. D., Leverrier, S., Weist, M., Porter, M., Wu, Z., Kanno, Y., et al. (2007). A Fas-Associated Death Domain Protein/Caspase-8-Signaling Axis Promotes S-Phase Entry and Maintains S6 Kinase Activity in T Cells Responding to IL-2. *The Journal of Immunology*, 2007, 179, 5291-5300.
- Aubin, F., (2003). Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *European journal of dermatology*, 13 (6), 515-523.
- Barbero, S., Barilà, D., Mielgo, A., Stagni, V., Clair, K., and Stupack, D., (2008). Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 283 (19), 13031-13034.
- Barbero, S., Mielgo, A., Torres, V., Teitz, T., Shields, D. J., Mikolon, D., Bogoyo, M., et al. (2009). Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer research*, 69 (9), 3755-3763.
- Beckmann, I.-A., (2011). Hautkrebs. *Deutsche Krebshilfe*, 10.
- Bell, B. D., Leverrier, S., Weist, B. M., Newton, R. H., Arechiga, A. F., Luhrs, K., Morrissette, N. S., et al. (2008). FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (43), 16677-16682.
- Benchoua, A., Couriaud, C., Guégan, C., Tartier, L., Couvert, P., Friocourt, G., Chelly, J., et al. (2002). Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose)polymerase-2. *The Journal of biological chemistry*, 277 (37), 34217-34222.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J., and Miller, L. K., (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology*, 68 (4), 2521-2528.

- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., et al. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell*, 11 (2), 529-541.
- Bonizzi, G., and Karin, M., (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25 (6), 280-288.
- Campisi, J., (2005). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science*, 309 (5736), 886-887.
- Carr, R., Taibjee, S., and Sanders, D., (2007). Basaloid skin tumours: Basal cell carcinoma. *Current Diagnostic Pathology*, 13 (4), 252-272.
- Cathelin, S., Rébé, C., Haddaoui, L., Simioni, N., Verdier, F., Fontenay, M., Launay, S., et al. (2006). Identification of proteins cleaved downstream of caspase activation in monocytes undergoing macrophage differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 281 (26), 17779-17788.
- Chan, F., (2007). Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine*, 37 (2), 101-107.
- Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E., and Yang, X., (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *The EMBO journal*, 22 (16), 4132-4142.
- Chaudhary, P. M., Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L., and Hood, L., (2000). Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene*, 19 (39), 4451-4460.
- Cheung, H. H., Kern, C. J., Mahoney, D. J., and Korneluk, R. G., (2008). The RING Domain of cIAP Mediates the Degradation of RING-bearing Inhibitor of Apoptosis Proteins by Distinct Pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 2729 -2740.
- Costas, C., Sanchez, M. D., Sequeira-Mendes, J., and Gutierrez, C., (2011). Progress in understanding DNA replication control. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 181 (3), 203-209.
- Crook, N. E., Clem, R. J., and Miller, L. K., (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology*, 67 (4), 2168-2174.
- Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H.-G., Tsang, B. K., et al. (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *The Journal of biological chemistry*, 279 (7), 5405-5412.
- Declercq, W., Takahashi, N., and Vandenabeele, P., (2011). Dual Face Apoptotic Machinery: From Initiator of Apoptosis to Guardian of Necroptosis. *Immunity*, 35 (4), 493-495.

- Denault, J.-B., Eckelman, B. P., Shin, H., Pop, C., and Salvesen, G. S., (2007). Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9. *The Biochemical journal*, 405 (1), 11-19.
- Desplanques, G., Giuliani, N., Delsignore, R., Rizzoli, V., Bataille, R., and Barillé-Nion, S., (2009). Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. *Haematologica*, 94 (1), 87-93.
- 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. *The EMBO journal*, 18 (19), 5242-5251.
- 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 (6639), 300-304.
- Deveraux, Q. L., and Reed, J. C., (1999). IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes and Development*, 14, 239-252.
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., et al. (2004). An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279 (33), 34087-34090.
- Eckelman, B. P., and Salvesen, G. S., (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *The Journal of biological chemistry*, 281 (6), 3254-3260.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., and Scott, F. L., (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, 7 (10), 988-994.
- Edmondson, S. R., Russo, V. C., McFarlane, C., Wraight, C. J., and Werther, G., (1999). Interactions between growth hormone, insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor in melanocyte growth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84 (5), 1638-1644.
- Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong, L., Rawlinson, L., Mason, J. C., Haskard, D. O., et al. (2008). NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *The Journal of biological chemistry*, 283 (11), 7036-7045.
- Evan, G. I., and Vousden, K. H., (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411 (6835), 342-348.
- Fabrocini, G., Mazzella, C., Pastore, F., Monfrecola, A., Annunziata, M. C., Mauriello, M. C., D'Arco, V., et al. (2011). A new classification and clinical predictivity for some naevus variants. *ISRN oncology*, 2011, 536-552.

- Feng, S., Yang, Y., Mei, Y., Ma, L., Zhu, D., Hoti, N., Castanares, M., et al. (2007). Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular signalling*, 19 (10), 2056-2067.
- Fridman, J. S., and Lowe, S. W., (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22 (56), 9030-9040.
- Fu, J., Jin, Y., and Arend, L. J., (2003). Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *The Journal of biological chemistry*, 278 (52), 52660-52672.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S., (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal*, 384 (Pt 2), 201-232.
- Fulda, S., (2009). Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer letters*, 281 (2), 128-133.
- Ganten, T. M., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Büchler, P., Haas, T. L., Schader, M. B., et al. (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clinical cancer research*, 12 (8), 2640-2646.
- Gerlach, B., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., Emmerich, C. H., Rieser, E., Haas, T. L., Webb, A. I., et al. (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 471 (7340), 591-596.
- Gilot, D., Serandour, A.-L., Ilyin, G. P., Lagadic-Gossmann, D., Loyer, P., Corlu, A., Coutant, A., et al. (2005). A role for caspase-8 and c-FLIPL in proliferation and cell-cycle progression of primary hepatocytes. *Carcinogenesis*, 26 (12), 2086-2094.
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., et al. (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitinbinding domain that regulates NF- κ B as well as cell survival and oncogenesis. *Natur. Cell. Biol.*, 10 (11), 1309-1317.
- Halliday, G. M., Damian, D. L., Rana, S., and Byrne, S. N., (2011). The suppressive effects of ultraviolet radiation on immunity in the skin and internal organs: Implications for autoimmunity. *Journal of dermatological science*, 1-7.
- Han, Z., Hendrickson, E., Bremner, T., and Wyche, J. H., (1997). A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 272 (20), 13432-13436.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., and Francisco, S., (2000). The Hallmarks of Cancer. *Hormone Research*, 100, 57-70.

-
- Helfer, B., Boswell, B. C., Finlay, D., Cipres, A., Vuori, K., Bong Kang, T., Wallach, D., et al. (2006). Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer research*, 66 (8), 4273-4278.
- Hellman, S., and Rosenberg, S. A., (2009). Cancer: Principles and Practice of Oncology Collections. *Clinical Medicine*, (7), 2009.
- Holly, E. A., Kelly, J. W., Shpall, S. N., and Chiu, S. H., (1987). Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 17 (3), 459-468.
- Hougardy, B., Maduro, J. H., van der Zee, A., de Groot, D., van den Heuvel, F., de Vries, E., and de Jong, S., (2006). Proteasome inhibitor MG132 sensitizes HPV-positive human cervical cancer cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *International journal of cancer*, 118 (8), 1892-1900.
- Hu, S., and Yang, X., (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *The Journal of biological chemistry*, 278 (12), 10055-10060.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., and Wu, H., (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, 104 (5), 781-790.
- Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G., and Wu, H., (2003). Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *The Journal of biological chemistry*, 278 (49), 49517-49522.
- Hughes, M. A., Harper, N., Butterworth, M., Cain, K., Cohen, G. M., and MacFarlane, M., (2009). Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Molecular cell*, 35 (3), 265-279.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C., and Korneluk, R. G., (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 12 (9), 1543-1568.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H., (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*, 2 (4), 277-288.
- John, A. R., (1981). The Optics of Human Skin. *The Journal of investigative dermatology*, 77 (1), 13-19.
- Kaiser, W. J., Upton, J. W., Long, A. B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L. P., Hakem, R., Caspary, T., et al. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 471 (7338), 368-372.

- Karin, M., (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, 3, 221-227.
- Kastan, M. B., Canman, C. E., and Leonard, C. J., (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer metastasis reviews*, 14 (1), 3-15.
- Krueger, G., and Stingl, G., (1989). Immunology/inflammation of the skin - a 50-year perspective. *The Journal of investigative dermatology*, 92, 32S-51S.
- Kulms, D., and Schwarz, T., (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine*, 16 (5), 195-201.
- Kulms, D., Pöppelmann, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (14), 7974-7979.
- Labib, K., and De Piccoli, G., (2011). Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366 (1584), 3554-3561.
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C., (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, 24 (33), 5137-5148.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S., (2003). The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell death and differentiation*, 10 (1), 144-155.
- Lee, K.-H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schütze, S., Peter, M. E., et al. (2006). The role of receptor internalization in CD95 signaling. *The EMBO journal*, 25 (5), 1009-1023.
- Lens, S. M., Kataoka, T., Fortner, K. A., Tinel, A., Ferrero, I., Macdonald, R. H., Hahne, M., et al. (2002). The Caspase 8 Inhibitor c-FLIP L Modulates T-Cell Receptor-Induced Proliferation but Not Activation-Induced Cell Death of Lymphocytes. *Society*, 22 (15), 5419-5433.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M., Kelliher, M., Lipkowitz, S., and Liu, Z. G., (2000). The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Molecular and cellular biology*, 20 (18), 6638-6645.
- Liou, J., Matijevic-Aleksic, N., Lee, S., and Wu, K., (2007). Prostacyclin Inhibits Endothelial Cell XIAP Ubiquitination and Degradation. *Journal of Cellular Physiology*, (February), 840-848.
- Liu, W.-H., Hsiao, H.-W., Tsou, W.-I., and Lai, M.-Z., (2007). Notch inhibits apoptosis by direct interference with XIAP ubiquitination and degradation. *The EMBO journal*, 26 (6), 1660-1669.

-
- Lopez, J., and Meier, P., (2010). To fight or die - inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death. *Current opinion in cell biology*, 22 (6), 872-881.
- Lynch, R. G., (2009). Apoptosis: Programmed Cell Death. *British Journal of Cancer*, 4 (1), 34-35.
- MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S. B., and Cohen, G. M., (2002). Proteasomemediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 277 (39), 36611-36616.
- Maelfait, J., and Beyaert, R., (2008). Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochemical pharmacology*, 76 (11), 1365-1373.
- Mallone, S., De Vries, E., Guzzo, M., Miden, E., Verne, J., Coebergh, J. W., Marcos-Gragera, R., et al. (2011). Descriptive epidemiology of malignant mucosal and uveal melanomas and adnexal skin carcinomas in Europe. *European journal of cancer* 48 (8), 1167-1175.
- Matsumura, Y., and Ananthaswamy, H. N., (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and applied pharmacology*, 195 (3), 298-308.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, a, Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E., (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal*, 16 (10), 2794-2804.
- Micheau, O., and Merino, D., (2004). Controlling TRAIL-mediated caspase-3 activation. *Leukemia*, 10 (18), 1578-1580.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., et al. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, 277 (47), 45162-45171.
- Mielgo, A., Torres, V. A., Clair, K., Barbero, S., and Stupack, D. G., (2009). Paclitaxel promotes a caspase 8-mediated apoptosis through death effector domain association with microtubules. *Oncogene*, 28 (40), 3551-3562.
- Mielgo, A., Torres, V. A., Schmid, M. C., Graf, R., Zeitlin, S. G., Lee, P., Shields, D. J., et al. (2009). The death effector domains of caspase-8 induce terminal differentiation. *PloS one*, 4 (11), e7879.
- Miller, L. K., (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in cell biology*, 9 (8), 323-328.
- Miyamura, Y., Coelho, S. G., Wolber, R., Miller, S. a, Wakamatsu, K., Zmudzka, B. Z., Ito, S., et al. (2007). Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 20 (1), 2-13.

- Moll, U. M., and Schramm, L. M., (1998). p53 - An Acrobat in Tumorigenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 9 (1), 23-37.
- Morton, D. L., Hsueh, E. C., Essner, R., Foshag, L. J., O'Day, S. J., Bilchik, A., Gupta, R. K., et al. (2002). Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Annals of surgery*, 236 (4), 438-448.
- Nakajima, A., Kojima, Y., Nakayama, M., Yagita, H., Okumura, K., and Nakano, H., (2008). Downregulation of c-FLIP promotes caspase-dependent JNK activation and reactive oxygen species accumulation in tumor cells. *Oncogene*, 27 (1), 76-84.
- Nakajima, A., Komazawa-Sakon, S., Takekawa, M., Sasazuki, T., Yeh, W.-C., Yagita, H., Okumura, K., et al. (2006). An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *The EMBO journal*, 25 (23), 5549-5559.
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 279 (45), 46674-46677.
- Nesbit M., (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci.* 15 (3),1005-1010.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B. J., (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Immunology*, 9 (10), 679-691.
- Newsom-Davis, T., Prieske, S., and Walczak, H., (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14 (4), 607-623.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C., (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 139 (2), 271-279.
- Nishitani, H., and Lygerou, Z., (2002). Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes to cells: devoted to molecular and cellular mechanisms*, 7 (6), 523-534.
- Oberst, A., and Green, D. R., (2011). It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival, *Molecular Cell Biology*, 12 (November), 757-763.
- Oberst, A., Dillon, C. P., Weinlich, R., McCormick, L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G. S., and Green, D. R., (2011a). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*, 471 (7338), 363-367.

- Peter, M. E., and Krammer, P. H., (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation*, 10 (1), 26-35.
- Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A.-O., Newell, M. K., Owen, L. B., et al. (2007). The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*, 129 (3), 447-450.
- Pierce., (2003). NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents. *Manual*, 1-3.
- Pop, C., and Salvesen, G. S., (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry*, 284 (33), 21777-21781.
- Qureshi, A., Wei-Passanese, E. X., Li, T., and Han, J., (2012). Host risk factors for the development of multiple non-melanoma skin cancers. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, JEADV*, 2012 Feb 24.
- Rabinovitch, P., (2002). Introduction to cell cycle analysis, 1-34.
- Rami, A., Bechmann, I., and Stehle, J. H., (2008). Exploiting endogenous antiapoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Progress in neurobiology*, 85 (3), 273-296.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., et al. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104 (5), 791-800.
- Riedl, S., and Salvesen, G. S., (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Molecular cell biology*, 8 (5), 405-413.
- Salvesen, G., (1999). Caspase 8 initiating the death machine: Intense research into the signaling pathways of apoptosis. *Structure*, (Table 1), 225-229.
- Salvesen, G., and Duckett, C. S., (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Molecular cell biology*, 3 (6), 401-410.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., et al. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*, 17 (6), 1675-1687.
- Schile, A. J., García-Fernández, M., and Steller, H., (2008). Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes and development*, 22 (16), 2256-2266.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H., (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 32 (11-12), 1123-1136.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M., (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Cancer Research* 254 (3), 439-459.

- Shelley, M., Hartley, L., Fish, R., Groundwater, P., Morgan, J., Mort, D., Mason, M., et al. (1999). Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. *Cancer letters*, 135 (2), 171-180.
- Shi, R.-X., Ong, C.-N., and Shen, H.-M., (2005). Protein kinase C inhibition and xlinked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer research*, 65 (17), 7815-7823.
- Shi, Y., (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis Caspases, *Mol Cell. Mol. Cell*, 9 (3), 459-470.
- Shi, Y., (2006). Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Current opinion in cell biology*, 18 (6), 677-684.
- Shiozaki, E. N., and Shi, Y., (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 29 (9), 486-494.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., et al. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular cell*, 11 (2), 519-527.
- Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P. G., Day, C. L., Pakusch, M., Huang, D. C., et al. (2005). Determination of cell survival by RING-Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (45), 16182-16187.
- Silke, J., Kratina, T., Ekert, P. G., Pakusch, M., and Vaux, D. L., (2004). Unlike Diablo/smac, Grim promotes global ubiquitination and specific degradation of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and neither cause apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279 (6), 4313-43121.
- Sohn, D., Totzke, G., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Levkau, B., and Ja, R. U., (2006). The Proteasome Is Required for Rapid Initiation of Death Receptor-Induced Apoptosis. *Society*, 26 (5), 1967-1978.
- Srinivasa M., (2008). IAPs: What's in a name ? *Molecular Cell*, 30 (2), 123-135.
- Srinivasula, S M, Hegde, R., Saleh, a, Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R., et al. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410 (6824), 112-116.
- Stennicke, H. R., Jürgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., et al. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *The Journal of biological chemistry*, 273 (42), 27084-27090.

- Su, H., Bidère, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., et al. (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 307 (5714), 1465-1468.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R., (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular cell*, 8 (3), 613-621.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R., (2001). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (15), 8662-8667.
- Takahashi, T., Kondo, T., Tanaka, K., Hattori, S., Irie, S., Kudoh, S., Imura, S., et al. (2012). Measurement of solar UV radiation in Antarctica with collagen sheets. *Photochemical and photobiological sciences*, (15), 2012 March.
- Thayaparasingham, B., (2009). *Die TRAIL-Suszeptibilität humaner Melanomzellen: Bedeutung des Tumorprogressionsstadiums und Modulation durch Immunsuppressiva. Dissertation, 2009.*
- Thornberry, N., Rano, T., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 272 (29), 17907-17911.
- Timmer, J. C., and Salvesen, G. S., (2007). Caspase substrates. *Cell death and differentiation*, 14 (1), 66-72.
- Twiddy, D., and Cain, K., (2007). Caspase-9 cleavage, do you need it? *The Biochemical journal*, 405 (1), e1-2.
- van Raam, B. J., and Salvesen, G. S., (2011). Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: The caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochimica et biophysica acta*, 1824 (1), 113-122.
- Varfolomeev, E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., et al. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9 (2), 267-276.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A., (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry*, 280 (49), 40599-40608.

- Velculescu, V. E., and El-Deiry, W. S., (1996). Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clinical chemistry*, 42, 858-868.
- Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H. G., (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in Genetics*, 19 (5), 286-293.
- Vijuk, G., and Coates, A. S., (1998). Original article Survival of patients with visceral metastatic melanoma from an occult primary lesion: A retrospective matched cohort study. *Annals of Oncology*, 419-422.
- Vucic, D., Deshayes, K., Ackerly, H., Pisabarro, M. T., Kadkhodayan, S., Fairbrother, W. J., and Dixit, V. M., (2002). SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *The Journal of biological chemistry*, 277 (14), 12275-12279.
- Wallace-Brodeur, R., and Lowe, S. W., (1999). Clinical implications of p53 mutations. *Cellular and molecular life sciences*, 55 (1), 64-75.
- Wallach, D, Varfolomeev, E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., and Boldin, M. P., (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual review of immunology*, 17, 331-367.
- Wang, L., Du, F., and Wang, X., (2008). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133 (4), 693-703.
- Wang, X., (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Development*, 15, 2922-2933.
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., et al. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes and Development*, 14, 2060-2071.
- Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Rush, J., Hochstrasser, M., et al. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteosomal degradation. *Cell*, 137 (1), 133-145.
- Yan, N., and Shi, Y., (2005). Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 35-56.
- Yang, Y., (2000a). Ubiquitin Protein Ligase Activity of IAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli. *Science*, 288 (5467), 874-877.
- Yao, Z., Duan, S., Hou, D., Heese, K., and Wu, M., (2007). Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and upregulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism. *The EMBO journal*, 26 (4), 1068-1080.
- Yonish-Rouach, E., (1991). Wild type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352 (6333), 345-347.

- Yu, J., and Zhang, L., (2003). No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer cell*, 4 (4), 248-249.
- Yu, J., and Zhang, L., (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and biophysical research communications*, 331 (3), 851-858.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H., et al. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304 (5676), 1500-1502.
- Zhang, H.-G., Wang, J., Yang, X., Hsu, H.-C., and Mountz, J. D., (2004). Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene*, 23 (11), 2009-2015.
- Zimmermann, K., Bonzon, C., and Green, D. R., (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology and therapeutics*, 92 (1), 57-70.
- Zimmermann, K., and Green, D. R., (2001). How cells die: Apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (4), S99-S103.
- Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S. W., Wu, J. C., et al. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *The Journal of biological chemistry*, 278 (10), 8091-809

Anhang

A: Sequenzen

A1: XIAP-Sequenz

Homo sapiens X-linked inhibitor of apoptosis, mRNA (cDNA clone MGC:45369 IMAGE:5532247), complete cds

```
1 ccacgcgtcc ggccgcgggg cagttcgggc cggctgtcct ggcgcgaaaa ggtggacaag
61 tcctatthttc aagagaagat gactthttaac agthtttgaag gatctaaaaac ttgtgtacct
121 gcagacatca ataaggaaga agaathttgta gaagagthta atagattaaa aactthttgct
181 aaththtccaa gtggtagtcc tgtthtcagca tcaacactgg cacgagcagg gthttctttat
241 actggtgaag gagataccgt gcggtgcttt agttgtcatg cagctgtaga tagatggcaa
301 tatggagact cagcagttgg aagacacagg aaagtatccc caaathgcag atthtatcaac
361 ggctthttatc ttgaaaatag tgccacgcag tctacaaatt ctggtatcca gaatggtcag
421 tacaaagttg aaaactatct ggggaagcaga gatcathttg ccttagacag gccatctgag
481 acacatgcag actatctthtt gagaactggg caggttgtag atatatcaga caccatatac
541 ccgaggaacc ctgccatgta tagtgaagaa gctagattaa agtcctthta gaactggcca
601 gactatgctc acctaacccc aagagagtha gcaagtgctg gactctacta cacaggtatt
661 ggtgaccaag tgcagtgttt ttgttggtgg ggaaaactga aaaathggga accttgatg
721 cgtgcctggt cagaacacag gcgacactth cctaathgct tctthgtthtt ggccgggaat
781 cttaatatthc gaagtgaatc tgatgctgtg agttctgata ggaathtccc aaathcaaca
841 aathctthcaa gaaathccatc catggcagat tatgaagcac ggatctthac thttgggaca
901 tggatatact cagthtaaca ggagcagctt gcaagagctg gaththtatgc thtaggtgaa
961 ggtgataaag taaagtgttt tcaactgtgg ggagggctaa ctgathggaa gcccagtgaa
1021 gacccttggg aacaacatgc taaatggtat ccaggtgca aathatctgtht agaacagaag
1081 ggacaagaat atataaaca ththtaththt actaththc thgaggagtg tctgthaaga
1141 actactgaga aacaccatc actaactaga agaathgag ataccatctt ccaaaathctt
1201 atggtacaag aagctatac atgggggttc agththcaagg acathaaaga aathaatggag
1261 gaaaaaththc agathatctgg gagcaactat aathcacttg aggtctggt thcagatcta
1321 gtgaathgctc agaaagacag tatgcaagat gagtcaagtc agactthcath acagaaagag
1381 athagthactg aagagcagct aaggcgctg caagaggaga agctthgcaa aathctgtht
1441 gatagaaata thgctatcgt ththgttct tgtggacatc thgtcactthg thaaathatg
1501 gctgaagcag thgacaagtg tccatgthgc tacacagthc thactthcaa gcaaaaththt
1561 ththathgctt aaththactc thathgtaggc athgththt gthctthatta cctgaththg
1621 atgthgthg thgactgact thathgathc aggathgath thcathgca ththgththc
1681 agthaggaaaa aaaaaththt atggcagtht ththagthggc aathathath thgaththct
1741 thgathththc aggthaththg thgathththc aththththth actgththth aathgaaacc
1801 athagthaa aathaaagac atcathactat aactgaaac aathgththth cathgththc
1861 thgaththath ththathgth agthgathth thathctggath thththathct ththcagathg
1921 gctthaaacaa thggagcttht thgthathth ththgthgath ththgthgath agagththath thththththc
1981 athaththth ththgthgath aathgathth aththththc gctgthgthgath agathgathgath
2041 ththththth aathththth aathththth aathththth aathththth aathththth
```

Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BC032729.1> (BC032729) [30.3.12]

A2: Caspase-8-Sequenz

Homo sapiens caspase 8, *apoptosis-related cysteine peptidase (CASP8), transcript variant A*, mRNA

```

1  gtgctctgag tttttggttt ctgtttcacc ttgtgtctga gctggctctga aggctggttg
61  ttcagactga gcttcctgccc tgccctgtacc ccgccaacag cttcagaaga aggtgactgg
121  tggctgcctg aggaatacca gtgggcaaga gaattagcat ttctggagca tctgctgtct
181  gagcagcccc tgggtgcgtc cactttctgg gcacgtgagg ttgggccttg gccgcctgag
241  cccttgagtt ggtcacttga accttgggaa tattgagatt atattctcct gcctttttaa
301  aagatggact tcagcagaaa tctttatgat attggggaac aactggacag tgaagatctg
361  gcctccctca agttcctgag cctggactac attccgcaaa ggaagcaaga acccatcaag
421  gatgccttga tgttattcca gagactccag gaaaagagaa tgttggagga aagcaatctg
481  tccttcctga aggagctgct cttccgaatt aatagactgg atttgctgat tacctaccta
541  aacactagaa aggaggagat ggaaagggaa cttcagacac caggcagggc tcaaatttct
601  gcctacaggt tccacttctg ccgcatgagc tgggctgaag caaacagcca gtgccagaca
661  cagtctgtac ctttctggcg gagggtcgat catctattaa taagggtcac gctctatcag
721  atttcagaag aagtgagcag atcagaattg aggtctttta agtttctttt gcaagaggaa
781  atctccaaat gcaaactgga tgatgacatg aacctgctgg atattttcat agagatggag
841  aagaggggtc tcctgggaga aggaaagttg gacatcctga aaagagtctg tgcccaaatc
901  aacaagagcc tgctgaagat aatcaacgac tatgaagaat tcagcaaagg ggaggagtgtg
961  tgtggggtaa tgacaatctc ggactctcca agagaacagg atagtgaatc acagactttg
1021  gacaaagttt accaaatgaa aagcaaacct cggggatact gtctgatcat caacaatcac
1081  aattttgcaa aagcacggga gaaagtgcc aaacttcaca gcattagggg caggaatgga
1141  acacacttgg atgcaggggc tttgaccacg acctttgaag agcttcattt tgagatcaag
1201  ccccacgatg actgcacagt agagcaaatc tatgagattt tgaaaatcta ccaactcatg
1261  gaccacagta acatggactg cttcatctgc tgtatcctct cccatggaga caagggcatc
1321  atctatggca ctgatggaca ggaggcccc atctatgagc tgacatctca gttcactggt
1381  ttgaagtgcc cttcccttgc tggaaaacce aaagtgtttt ttattcagggc ttgtcagggg
1441  gataactacc agaaaaggtat acctgttgag actgattcag aggagcaacc ctatttagaa
1501  atggatttat catcacctca aacgagatag atcccggatg aggtgactt cctgctgggg
1561  atggccactg tgaataactg tgtttcctac cgaaacctg cagagggaac ctagtacatc
1621  cagtcacttt gccagagcct gagagagcga tgtcctcgag gcgatgatat tctcaccatc
1681  ctgactgaag tgaactatga agtaagcaac aaggatgaca agaaaaacat ggggaaacag
1741  atgcctcagc ctactttcac actaagaaaa aaacttgtct tcccttctga ttgatggtgc
1801  tattttgttt gttttgtttt gttttgtttt tttgagacag aatctcgctc tgtcgcccag
1861  gctggagtgc agtggcgtga tctcggctca ccgcaagctc cgctcccgg gttcaggcca
1921  ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggg gccctccacc acactggct
1981  aattttttaa aaatattttt agtagagaca gggtttact gtgttagcca ggggtggtctt
2041  gatctcctga cctcgtgatc caccacctc ggctcccaa agtgcctggga ttacaggcgt
2101  gagccaccgc gcctggccga tggactatt tagatataac actatgttta tttactaatt
2161  ttctagattt tctactttat taattgtttt gcactttttt ataagagcta aagttaaata
2221  ggatattaac aacaataaca ctgtctcctt tctcttatgc ttaaggcttt gggaatgttt
2281  tttagctggtg gcaataaata ccagacagct acaaaatcca gctatgaata tagagggctt
2341  atgattcaga ttgttatcta tcaactataa gccactggtt aatattctat taactttaat
2401  tctctttcaa agctaaattc cacactacca cattaaaaaa attagaaagt agccacgtat
2461  ggtggctcat gtctataatc ccagcacttt gggagggtga ggtgggagga ttgcttgaac
2521  ccaagaggtc aaggctgcag tgagccatgt tcacaccgct gcaactcaagc ttgggtgaca
2581  gaacaagacc ccgtctcaaa aaaaattttt ttttaataa aacaaaattt gtttgaatc
2641  ttttaaaaat tcaaatgatt tttacaagtt ttaaataagc tctcccaaaa cttgctttat
2701  gccttcttat tgcttttatg atatataat gcttggctaa ctatatttgc tttttgctaa
2761  caatgctctg gggctttttt atgcatttgc atttgctctt tcatctctgc ttggattatt
2821  ttaaatcatt aggaattaag ttatctttaa aatttaagta tcttttttca aaaacatttt
2881  ttaatagaat aaaatataat ttgatcttat taaa

```

Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001228.4 (NM_001228) [30.3.12]

Persönliche Daten

Name	Hörnle
Vorname	Manuela
Adresse	Silberburgstrasse 43 70176 Stuttgart E-Mail: ManuelaHoernle@web.de
Geburtsdatum	23. Dezember 1981
Familienstand	ledig

Studium/Schulbildung

01/2009 – 04/2012	Dissertation am Institut für Zellbiologie und Immunologie Universität Stuttgart / Vaihingen; Arbeitsgruppe PD. Dr. D. Kulms
1/2008 – 09/2008	Diplomarbeit in der Abteilung Leitstrukturfindung / Structural Research Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG Biberach
10/2002 – 01/2008	Studium der Biologie an der Universität Ulm
10/1998 – 06/2001	Abitur: Matthias-Erzberger-Schule Biberach Leistungskurse: Ernährungslehre mit Chemie, Englisch
09/1992 – 07/1998	Mittlere Reife: Bischof-Sproll Bildungszentrum Biberach

Freiwilliges soziales Jahr

08/2001 – 06/2002	Freiwilliges soziales Jahr im Kreiskrankenhaus Biberach, Biberach an der Riss
-------------------	---