

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

***Apoptoseinduktion im malignen Melanom:  
Molekulare Vorgänge und Evaluation zukünftiger  
Möglichkeiten therapeutischer Zugänge***

Zofia Anna Graf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. H. H. D Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch

2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

(Albert-Ludwigs-Universität Freiburg)

Die Dissertation wurde am 06.10.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.11.2011 angenommen.



Dla moich rodziców



# Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind mittlerweile die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern. Die Inzidenz des malignen Melanoms wächst von Jahr zu Jahr. Der schwarze Hautkrebs ist durch seine hohe Resistenz gegenüber der Chemotherapie gekennzeichnet. Diese Therapieresistenz spiegelt sich in einer hohen Resistenz von Melanomzellen gegen Zytostatika *in vitro*, die sich wiederum als Resistenz gegen Apoptoseinduktion manifestiert. Eine gezielte Apoptoseinduktion in den transformierten Melanozyten ist deshalb nur schwer zu erzielen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze für die Induktion von Apoptose in aus menschlichen Patienten etablierten Melanomzelllinien getestet.

Die Stimulation der Melanomzelllinien mit den klinisch anwendbaren Chemotherapeutika Dacarbazin und Fotemustin induzieren kaum Apoptose *in vitro*. Die Kombination aus diesen Zytostatika und dem Bcl-2-Antagonisten ABT-737, welches die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-w und Bcl-x<sub>L</sub> bindet, resultierte jedoch in einer synergistischen Steigung der Apoptoserate in allen verwendeten Melanomzellen. Die wichtigste Funktion der Chemotherapeutika war hierbei die Neutralisation des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1, welche teilweise von der Induktion des BH3-only Proteins Noxa abhängig war. Entsprechend scheint die Synergie zwischen Zytostatika und ABT-737 auf der Fähigkeit zu beruhen, alle anti-apoptotischen Bcl-2-artigen Proteine gleichzeitig zu neutralisieren.

Das pro-apoptotische Potential des Immunrezeptors Toll-like Rezeptors 3 (TLR3) wurde in den Melanomzelllinien ebenfalls untersucht. Es gab Hinweise aus Vorarbeiten, dass TLR3 grundsätzlich pro-apoptotisches Potential hat, und wir verfolgen die Hypothese, dass zelluläre *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAPs) diese Aktivität regulieren. Durch die Verwendung des TLR3-Ligandes Poly I:C allein konnte kein Zelltod hervorgerufen werden. Die zusätzliche Inhibition der Proteinbiosynthese oder die Hemmung von IAPs durch LBW242, einen neuartigen IAP-Antagonisten, erlaubten jedoch eine effiziente Induktion von Apoptose. In beiden Fällen spielte die Aktivierung der Caspase-8 eine essentielle Rolle. Somit konnten die IAPs als negative Regulatoren der TLR3-vermittelten Apoptose identifiziert werden.

Eine Mehrheit der Melanome weist aktivierende Mutationen im *BRAF*-Gen auf, und die Inhibition des MAPK-Signalweges wird als therapeutischer Ansatz diskutiert. Die Hemmung des MAP-Kinasenweges durch den MEK-Inhibitor UO126 reichte allein nicht aus, um in den Melanomzellen Apoptose auszulösen. Die Kombination aus dem MEK-Inhibitor und ABT-737 induzierte jedoch effizient Apoptose. Es wurde nachgewiesen, dass der Beitrag von UO126 wesentlich auf der Reduktion des Mcl-1-Proteinspiegels beruhte, die zum größten Teil Noxa-unabhängig war. Die Inhibition der Kinase GSK3 durch CT98014, führte überraschend zu einer weiteren Erhöhung der Apoptose. Die Hemmung der GSK3 war ebenso mit der

Neutralisation von Mcl-1 verbunden, die jedoch mit der Induktion von Noxa zusammenhing. Somit konnten CT98014 sowie UO126 durch die Herunterregulation des Mcl-1-Proteinspiegels zusammen mit ABT-737 effektiv Apoptose induzieren.

In dieser Arbeit wurde eine große Resistenz der Melanomzellen gegen viele unterschiedliche anti-neoplastische Agenzien bestätigt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination von verschiedenen Modulatoren des apoptotischen Signalweges eine effiziente Apoptoseinduktion möglich ist. Die Analyse der molekularen Mechanismen während der Apoptose könnte daher Möglichkeiten zur „maßgeschneiderten“ Behandlung von Tumoren aufzeigen.

# Summary

Cancer is the most common cause of death in the developed countries, and the incidence of malignant melanoma is continuously growing. The so-called 'black skin cancer' shows high resistance against chemotherapy. This therapy resistance of the tumor is reflected by their low sensitivity to cytotoxic drugs *in vitro*, which again is manifested in the resistance of tumor cells to apoptosis induction. Specific apoptosis induction in malignant transformed melanocytes is therefore difficult to achieve. Several possibilities for the apoptosis induction in patient-derived melanoma cell lines were tested in this work.

The stimulation of melanoma cells with clinically used chemotherapeutics Dacarbazine and Fotemustine induces very little apoptosis *in vitro*. However, the combination of those cytotoxic agents with the BH3-antagonist ABT-737, which binds the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-w and Bcl-x<sub>L</sub>, resulted in a synergistic increase in apoptosis in all of the tested melanoma cell lines. The most important function of those chemotherapeutics was their ability to neutralize the anti-apoptotic protein Mcl-1 in a manner that was partially dependent on the induction of the BH3-only protein Noxa. The apoptogenic co-operation between the above drugs and ABT-737 seems to be based on the mechanism that all anti-apoptotic members of the Bcl-2 family were neutralized.

Further, the pro-apoptotic potential of the Toll-like receptor 3 (TLR3) was tested in the melanoma cell lines. There are indications from other studies that TLR3 possesses a pro-apoptotic potential and we pursued the hypothesis that this activity is regulated by the Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs). The synthetic TLR3 agonist poly I:C did not induce apoptotic cell death if used on its own. However, concomitant inhibition of protein synthesis or the inhibition IAPs via LBW242, a novel IAP-antagonist, led to efficient induction of apoptosis. In both cases the activation of caspase-8 was the essential step in apoptosis induction. Thus, IAPs were identified as negative regulators of the TLR3-mediated apoptosis. Most melanomas bear a *BRAF* mutation and the inhibition of the MAPK signaling pathway is under discussion as a possible therapy. The inhibition of MEK via the drug UO126 was unable to induce apoptosis in the melanoma cells tested in this study. Nevertheless the combination of UO126 and ABT-737 showed very effective pro-apoptotic activity. The pro-apoptotic function of UO126 was linked to the reduction of Mcl-1 protein levels and this effect occurred, for the most part, independently of Noxa. The inhibition of the kinase GSK3 with CT98014 surprisingly increased apoptosis. The inhibition of GSK3 reduced Mcl-1 protein levels as a consequence of the up-regulation of Noxa. Therefore, UO126 and CT98014 were able to synergize with ABT-737 through to their ability to neutralize Mcl-1, hence inducing apoptosis in melanoma cells.

The experiments shown in this study confirm a very high resistance of melanoma cells against various anti-neoplastic agents. However, the results also indicate that through the

combination of different modulators of the apoptotic pathway an efficient induction of apoptosis is possible. Thus, the analysis of the molecular mechanisms during apoptosis might be a step towards a 'personalized' therapy of cancer.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Summary</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Apoptose</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 <i>Die physiologische Bedeutung und die Morphologie der Apoptose</i> .....	1
1.1.2 <i>Die Signaltransduktionswege der Apoptose</i> .....	2
1.1.3 <i>Die Bcl-2-Proteinfamilie</i> .....	5
1.1.4 <i>IAPs und das Smac-Mimetikum LBW242</i> .....	18
1.1.5 <i>Signaltransduktionswege, die Apoptose steuern können</i> .....	21
<b>1.2 Das maligne Melanom</b> .....	<b>30</b>
1.2.1 <i>Die Entstehung des malignen Melanoms</i> .....	30
1.2.2 <i>Behandlung des Melanoms</i> .....	34
1.2.3 <i>Die Rolle von Apoptose und von Proteinen der Bcl-2-Familie bei der Carcinogenese</i> .....	37
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>39</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>41</b>
2.1.1 <i>Zelllinien</i> .....	41
2.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	42
2.1.3 <i>Medien</i> .....	43
2.1.4 <i>Kit Systeme</i> .....	44
2.1.5 <i>Antikörper</i> .....	44
2.1.6 <i>BH3-Peptide</i> .....	45
2.1.7 <i>siRNA</i> .....	45
2.1.8 <i>Chemotherapeutika und andere proapoptotische Stimuli</i> .....	46
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>46</b>

2.2.1	Zellkultur .....	46
2.2.2	Herstellung der Gesamtzellextrakte .....	47
2.2.3	Messung der Proteinkonzentration .....	47
2.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.2.5	Western Blot .....	48
2.2.6	Strippen von Membranen .....	48
2.2.7	Protein-Herunterregulation mittels RNAi.....	48
2.2.8	Induktion von Apoptose .....	49
2.2.9	Apoptoseassays .....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz des Bcl-2-Antagonisten ABT-737 und verschiedener Chemotherapeutika.....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Stimulation von Melanomzellen mit der Kombination aus Fotemustin oder Dacarbazin mit ABT-737 .....	51
3.1.2	Stimulation von Melanomzellen nach RNAi gegen Bcl-2-Proteine.....	54
3.1.3	Freisetzung von Cytochrom c durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin oder Dacarbazin mit ABT-737 .....	56
<b>3.2</b>	<b>Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch die Stimulation des Toll-like Rezeptors 3 mit Poly I:C und Inhibition der IAPs mit dem Smac-Mimetikum LBW242 .....</b>	<b>57</b>
3.2.1	Stimulation der Melanomzellen mit der Kombination von Poly I:C und Cycloheximid.....	58
3.2.2	Stimulation der Melanomzellen mit der Kombination von Poly I:C und Smac-Mimetikum LBW242.....	62
<b>3.3</b>	<b>Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz des MEK-Inhibitors UO126 und ABT-737 .....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
4.1	Die Kombination von Dacarbazin bzw. Fotemustin und ABT-737 führt zu synergistischer Apoptoseinduktion in Melanomzellen.....	85
4.2	LBW242 sensibilisiert Melanomzelllinien für die TLR3-vermittelte Apoptose.....	89
4.3	Die Kombinationsbehandlung mit UO126 und ABT-737 induziert Apoptose in Melanomzellen .....	95
4.4	Schlussbemerkungen .....	101

<b>5</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>XV</b>
<b>6</b>	<b><i>Publikationen</i></b> .....	<b>XLVIII</b>
	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>L</b>



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zwei Signaltransduktionswege, extrinsischer (Rezeptor-vermittelter) und intrinsischer (mitochondrialer) Weg, die während der Apoptose eingeschaltet werden können. ....	4
Abbildung 2: Die wichtigsten Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie.....	7
Abbildung 3: Zwei mögliche Mechanismen für die Aktivierung von Effektoren Bax/Bak.....	9
Abbildung 4: Bindungsmuster für die BH3-only Proteine und deren Targets Bcl-2-artige Mitglieder.....	11
Abbildung 5: Schematische Struktur der humanen XIAP und cIAPs.....	19
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Signaltransduktionsweges via TLR3.....	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung des MAPK-Signaltransduktionsweges.....	26
Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges. ....	29
Abbildung 9: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin oder Dacarabazin mit ABT-737 nach 24 h.....	52
Abbildung 10: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin oder Dacarabazin mit ABT-737 nach 48 h.....	53
Abbildung 11: Einfluss der Stimulation mit Dacarabazin oder Fotemustin auf die Proteinexpression der Mitglieder der Bcl-2-Familie in Melanomzellen. ....	54
Abbildung 12: Apoptoseinduktion in Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Dacarabazin und ABT-737.....	55
Abbildung 13: Apoptoseinduktion in Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin und ABT-737. ....	56
Abbildung 14: Freisetzung des Cytochroms c aus den Mitochondrien der 1205Lu Zellen durch BH3-Peptide und ABT-737 nach der Vorstimulierung mit Fotemustin bzw. Dacarabazin.....	57
Abbildung 15: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Poly I:C und Cycloheximid.....	59
Abbildung 16: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch Poly I:C und Cycloheximid nach dem transienten Knock-down von Caspase-8. ....	60
Abbildung 17: Die Effizienz des Caspase-8 Knock-downs in Melanomzellen mittels siRNA. ....	60
Abbildung 18: Einfluss der Stimulation mit Poly I:C und Cycloheximid auf die Proteinexpression der Caspase-8 und deren Inhibitor FLIP in Melanomzellen. ....	61
Abbildung 19: Einfluss der Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid auf die Proteinexpression der IAPs in Melanomzellen.....	62
Abbildung 20: Apoptoseinduktion in Melanomzelllinien durch den kombinierten Einsatz von Poly I:C und LBW242. ....	63

Abbildung 21: Zusammenstellung der Apoptoseinduktion in Melanomzelllinien durch den kombinierten Einsatz von Poly I:C und LBW242.....	64
Abbildung 22: Einfluss der Stimulation mit dem Smac-Mimetikum LBW242 auf die Proteinexpression der IAPs in Melanomzellen.....	65
Abbildung 23: Zunahme der Poly I:C-induzierten Apoptose in WM35 Zellen durch den transienten Knock-down von cIAP1.....	66
Abbildung 24: Einfluss der Stimulation mit Poly I:C und LBW242 auf die Spaltung von Caspase-8 und die Expression von FLIP in Melanomzellen. ....	67
Abbildung 25: Einfluss der Einzelstimulation mit Poly I:C oder LBW242 auf die Spaltung von Caspase-8 in Melanomzellen. ....	67
Abbildung 26: Schutz vor Poly I:C/LBW242-induzierter Apoptose durch den transienten Knock-down von Caspase-8 in Melanomzellen. ....	68
Abbildung 27: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Poly A:U und LBW242.....	69
Abbildung 28: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 mit ABT-737 nach 24 h.....	70
Abbildung 29: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 mit ABT-737 nach 48 h.....	71
Abbildung 30: Einfluss der Stimulation mit UO126 auf die Proteinexpression von Mcl-1 und Noxa in WM35 Melanomzellen. ....	72
Abbildung 31: Apoptoseinduktion in 1205Lu Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 bzw. PD98059 mit ABT-737 nach 6 h. ....	73
Abbildung 32: Apoptoseinduktion in Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 bzw. PD98059 mit ABT-737 nach 16 h. ....	74
Abbildung 33: Einfluss der Stimulation der KD-Melanomzellen mit UO126, PD98059 und ABT-737 auf die Expression von Mcl-1 und Noxa sowie Phosphorylierung von ERK. ...	75
Abbildung 34: Einfluss der Stimulation der Kontrollzellen und shNoxa-Zellen mit UO126 auf die Expression von Mcl-1 und Noxa sowie Phosphorylierung von ERK. ....	76
Abbildung 35: Einfluss der Stimulation der Kontrollzellen mit UO126 auf den Mcl-1-Abbau im Zeitablauf. ....	76
Abbildung 36: Die Proteinspiegel von Mcl-1 und Noxa nach der Hemmung des Proteasoms mit MG132 in den Knock-down Melanomzellen vor der Stimulation mit UO126 alleine und UO126 mit ABT-737. ....	77
Abbildung 37: Die Apoptose der WT Melanomzellen induziert durch die Stimulation mit UO126, ABT-737 und CT98014. ....	79
Abbildung 38: Einfluss der Stimulation mit UO126, ABT-737 und CT98014 auf die Expression der Proteine aus der Bcl-2-Familie.....	79

Abbildung 39: Einfluss der Stimulation mit CT98014 auf die Expression von Mcl-1 und Noxa im Zeitablauf.....	80
Abbildung 40: Der apoptotische Zelltod der Knock-down Melanomzellen induziert durch die Stimulation mit UO126, ABT-737 und CT98014. ....	81
Abbildung 41: Einfluss der Stimulation der Knock-down Melanomzellen mit UO126, ABT-737, CT98014 bzw. deren Kombination auf die Expression von Bim <sub>EL</sub> , Noxa und A1 sowie Phosphorylierung von ERK. ....	82
Abbildung 42: Einfluss der Stimulation der shKontrollzellen mit UO126, ABT-737 und CT98014 auf die Mcl-1-Expression.....	83





# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die vereinfachte Übersicht der klinischen Stufen für das Melanom (Chudnovsky <i>et al.</i> 2005). .....	31
--	----



# Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
Bad	<i>bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>bcl-2-antagonist/killer</i>
Bax	<i>bcl-2 associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
BH	Bcl-2-Homologie ( <i>bcl-2 homology</i> )
Bid	<i>BH3-interacting-domain death agonist</i>
Bik	<i>bcl-2 interacting killer</i>
Bim	<i>bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BIR	<i>baculovirus IAP repeat</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BMF	<i>bcl-2-modifying factor</i>
CARD	Caspasenrekrutierungsdomäne ( <i>caspase recruitment domain</i> )
CDK	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin dependent kinase</i> )
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEBP $\alpha$	<i>CCAAT-enhancer binding protein-<math>\alpha</math></i>
CHOP	<i>CEBP homologous protein</i>
CHX	Cycloheximid
clAP	<i>cellular IAP</i>
CrmA	<i>caspase-8 inhibitor from cowpox virus</i>
Cy3	wasserlöslicher Cyanin-Farbstoff
(k)Da	(Kilo-)Dalton
Dct	<i>dopachrome tautomerase</i>
DD	Todesdomäne ( <i>death domain</i> )
DED	Todeseffektordomäne ( <i>death effector domain</i> )
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
DKO	Doppel-Knockout
DLC	Dyneins leichte Kette ( <i>dynein light chain</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )

DTIC	Dacarbazin
DTT	Dithiothreitol
E $\mu$	<i>immunoglobulin heavy chain enhancer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
FOXO	<i>the class O forkhead box transcription factor</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GSK	Glycogen-Synthase Kinase
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
IBM	<i>interacting BIR motif</i>
IL	Interleukin
IMS	Intermembranbereich ( <i>intermembrane space</i> )
IRF3/7	<i>IFN regulatory factor 3/7</i>
JAK	<i>the Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO	Knockout
LRR	Leucin-reiche Wiederholungen ( <i>leucin-rich repeats</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar, (Mol/l)
MAL/TIRAP	<i>MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC1R	Melanocortinrezeptor 1
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia 1</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MDM	<i>murine double minute 2</i>
MEK	MAP ERK Kinase 1
MITF	<i>the microphthalmia-associated transcription factor</i>

MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyt-stimulierendes Hormon
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Mule	<i>Mcl-1 ubiquitin ligase E3</i>
c-Myc	<i>avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88 ( <i>myeloid differentiation factor 88</i> )
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NIK	<i>NF-<math>\kappa</math>B-inducing kinase</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
RGP	<i>radial growth phase</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
PKB	Protein Kinase B
Poly A:U	Polyadenylische:polyuridyliche Säure
Poly I:C	Polyinosinische:polycytidylische Säure
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RAF	<i>rapidly growing fibrosarcomas</i>
RAS	Ratten-Sarkom (Rat Sarcoma)
RB	Retinoblastom Protein
riCTOR	<i>rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
RING	RING ( <i>really interesting new gene</i> )-Domäne mit der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase ( <i>receptor tyrosine kinases</i> )
SAR-by-NMR	<i>structure–activity relationship by nuclear magnetic resonance</i>

SARM	<i>sterile alpha and HEAT/Armadillo motif protein</i>
SCF <sup>FBW7</sup>	<i>a SKP1–cullin-1–F-box complex that contains FBW7 as the F-box protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sh	<i>short hairpin</i>
SH2	Src-Homologie 2
si	<i>short interfering</i>
ss	singelsträngig ( <i>single stranded</i> )
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
tBid	gespaltenes Bid ( <i>truncated Bid</i> )
TAB1	<i>TAK1 associating subunit 1</i>
TAK1	<i>TGF-β activating kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK Binding Kinase 1</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris-buffered saline</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor (IL1-R) homology domain</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor ( <i>tumor necrosis factor</i> )
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factors</i>
TRAIL	TNF-verwandter apoptose-induzierter Ligand
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
TRAM	<i>Toll-receptor-associated molecule</i>
TRIF	<i>Toll-receptor-associated activator of interferon</i>
Tris	Tris (hydroxy-methyl)-aminomethan
UBA	Ubiquitin-Bindungsdomäne
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VGP	<i>vertical growth phase</i>
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/sec}^2$ )
XIAP	IAP gekoppelt mit dem X-Chromosom ( <i>X-chromosome-linked IAP</i> )

# 1 Einleitung

## 1.1 Apoptose

Vor fast 170 Jahren wurde zum ersten Mal die gezielte Entfernung von nicht mehr benötigten Körperteilen bei der Entwicklung der Kaulquappen einer Geburtshelferkröte von Carl Vogt beobachtet (Vogt 1842). Danach, im 19. Jahrhundert, beschrieben viele Wissenschaftler, hauptsächlich Embryologen, den natürlich vorkommenden Zelltod (Clarke und Clarke 1996). Jedoch erst über 120 Jahre nach Vogts Beobachtungen sprachen die zwei US-amerikanischen Wissenschaftler Lockshin und Williams vom „programmierten Zelltod“ (Lockshin und Williams 1965). Sie haben diesen Begriff für die Muskeldegeneration während der Entwicklung einer Mottenlarve verwendet. Das Wort „Apoptose“ wurde allerdings im Jahr 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt (Kerr *et al.* 1972). Es begann eine lange und immer noch nicht abgeschlossene Suche nach Antworten auf Fragen wie: Welche Aufgabe hat Apoptose zu erfüllen? Welche Signale lösen die apoptotischen Vorgänge aus? oder Welche Mechanismen werden während des Vorgangs eingeschaltet?

### 1.1.1 Die physiologische Bedeutung und die Morphologie der Apoptose

Mittlerweile ist es bekannt, dass Apoptose eine sehr wichtige Rolle in mehrzelligen Organismen spielt. Der apoptotische Zelltod ist von dem Fadenwurm *C. elegans*, über die Fruchtfliege *Drosophila* bis zu den Säugetieren ein in Teilen genetisch konservierter Prozess (Danial und Korsmeyer 2004). Während der normalen Embryonalentwicklung, bei Immunreaktionen oder für die Aufrechthaltung der Gewebekomöostase ist Apoptose essentiell. Störungen der Apoptose können zu Tumorentwicklung und Autoimmunkrankheiten beitragen (Kerr *et al.* 1972; Danial und Korsmeyer 2004; Strasser 2005; Adams und Cory 2007). Durch Apoptose sollen die nicht mehr benötigten, beschädigten oder sogar gefährlichen Zellen eliminiert werden (Danial und Korsmeyer 2004; Youle und Strasser 2008). Allerdings sollen die sterbenden Zellen immer im Gleichgewicht zu den sich teilenden Zellen stehen, somit spielt die Apoptose eine ergänzende jedoch entgegengesetzte Rolle zur der von Mitose (Kerr *et al.* 1972; Vaux und Strasser 1996).

Kerr und Kollegen haben nicht nur die Apoptose von der Nekrose abgegrenzt, sondern auch eine sehr detaillierte Studie mit Hilfe des Elektronenmikroskops durchgeführt, in der sie die morphologischen Merkmale des Vorgangs genau beschrieben. Apoptose verläuft morphologisch in verschiedenen Stufen: zuerst werden die sogenannten „*apoptotic bodies*“ gebildet, gefolgt von deren Phagozytose durch die Zellen aus der Umgebung. Bevor jedoch die apoptotischen Körperchen entstehen, separiert sich die sterbende Zelle von ihrem zellulären Umfeld. Es folgen die Kondensierung des Chromatins und die Fragmentierung der

DNA. Die ganze Zelle schrumpft, aber der Zellinhalt und alle Organellen bleiben durch die Zellmembranblasen umschlossen, sodass es zu keiner inflammatorischen Antwort kommt (Kerr *et al.* 1972; Hacker 2000).

### **1.1.2 Die Signaltransduktionswege der Apoptose**

Die morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose sind Folgen der Aktivierung einer Gruppe von Proteasen, den sogenannten Caspasen (Thornberry und Lazebnik 1998). Die Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystinproteasen, die während des programmierten Zelltodes eine Reihe von verschiedenen Zielproteinen in der Zelle spalten. Somit fungieren sie gewissermaßen als Exekutive der Apoptose und führen die Zellzerstörung aus. In den nicht apoptotischen Zellen liegen sie im Zytoplasma als inaktive Proenzyme vor. Die sogenannten Effektorcaspasen (Caspase-3, -7, und -9) benötigen die proteolytische Aktivität der Initiatorcaspasen (Caspase-8, -9 und -10), um zu ihrer aktiven Form gespalten zu werden. Dagegen können die Initiatorcaspasen durch Autokatalyse aktiviert werden. Bei der Aktivierung der Caspasen assoziieren die kleine und die große Untereinheit von zwei Caspasmolekülen, sodass die aktive Form ein Tetramer aus zwei Heterodimeren bildet und dabei ein oder zwei aktive Zentren besitzt (Thornberry und Lazebnik 1998). Ein Substraterkennungsmotiv aus vier Aminosäuren wurde für jede Caspase identifiziert, das die Bestimmung von Spaltsubstraten sowie Caspaseninhibitoren ermöglicht hat (Thornberry *et al.* 1997).

In Säugern können Caspasen über zwei verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden. Der extrinsische oder Rezeptor-vermittelte Weg wird durch die Stimulation der sogenannten Todesrezeptoren eingeschaltet, während die Aktivierung des intrinsischen oder mitochondrialen Weges durch die Proteine der Bcl-2 Familie reguliert wird (Abbildung 1).

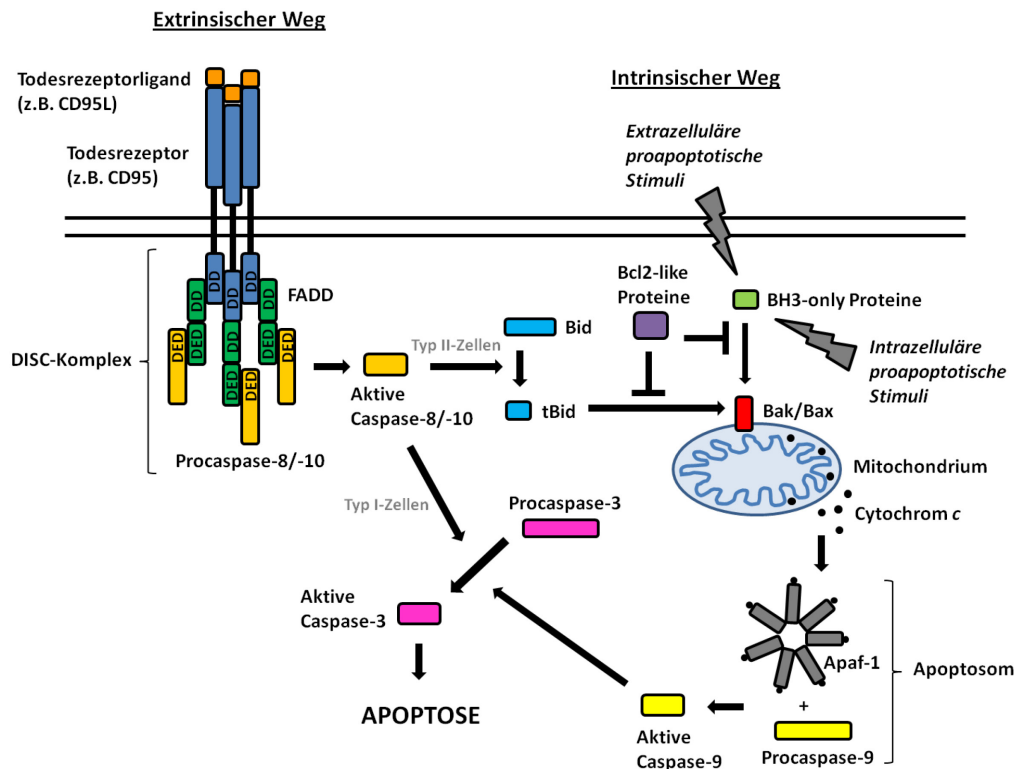
#### **1.1.2.1 Der extrinsische Signaltransduktionsweg**

Der extrinsische oder Rezeptor-vermittelte apoptotische Signaltransduktionsweg (Abbildung 1, links) wird durch die Aktivierung von den membrangebundenen Todesrezeptoren aus der TNF(*tumor necrosis factor*)-Rezeptorfamilie, zu denen beispielsweise TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNFR1, TNFR2), TRAIL(*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Rezeptoren (TRAILR1 und -2 auch bezeichnet als DR4 und 5) oder der Fas (CD95/Apo-1) Rezeptor gehören, vermittelt. Durch die Bindung von spezifischen Liganden an ihre Rezeptoren (z.B. TNF an TNFR, TRAIL an TRAILR oder FasL an Fas) kommt es zur Oligomerisierung der Rezeptormoleküle auf der Zellmembran und zur Rekrutierung des Adaptormoleküls FADD (*Fas-associated protein with death domain*) an die Todesdomänen (DD, *death domains*) am zytosolischen C-Terminus des Rezeptors. Eine andere Domäne des FADD-Moleküls, nämlich die Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) ist für die Rekrutierung der



Initiatorcaspase verantwortlich (Caspase-8 oder -10) (Ashkenazi 2002; Falschlehner *et al.* 2007; Johnstone *et al.* 2008; Strasser *et al.* 2009). Es entsteht ein Multiproteinkomplex, der sogenannte DISC (*death-inducing signalling complex*) (Kischkel *et al.* 1995), dessen Bildung die Autoaktivierung der Initiatorcaspasen als Folge hat. Diese Aktivierung kann durch das zelluläre Protein FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) inhibiert werden (Irmeler *et al.* 1997). Es existieren bis jetzt drei Splicevarianten dieses Proteins: cFLIP<sub>S</sub>, cFLIP<sub>R</sub> und cFLIP<sub>L</sub>. Auch wenn beide cFLIP<sub>S</sub> sowie cFLIP<sub>L</sub> zu dem DISC-Komplex über ihre Todeseffektordomänen rekrutiert werden, scheinen sie möglicherweise gegensätzliche Funktionen zu haben. Während cFLIP<sub>S</sub> (und möglicherweise auch cFLIP<sub>R</sub>) die Aktivierung von Caspase-8, wahrscheinlich durch die kompetitive Bindung an FADD blockiert, werden beim cFLIP<sub>L</sub> pro- sowie anti-apoptotische Fähigkeiten diskutiert (Falschlehner *et al.* 2007).

In manchen Zelltypen (Typ I-Zellen) ist die Aktivierung der Initiatorcaspasen ausreichend, um weiter die Effektorcaspasen zu spalten und den Zelltod vollständig auszuführen. In anderen Zellen (Typ II-Zellen) wird die Aktivierung von Caspase-8 durch die Spaltung von einem BH3-only Protein Bid zu seiner aktiven Form tBid (*truncated Bid*) herbeigeführt (Li *et al.* 1998; Scaffidi *et al.* 1998). Das gespaltene Bid kann dann entweder die pro-apoptotischen Proteine Bak und/oder Bax direkt aktivieren oder die anti-apoptotischen Fähigkeiten der Bcl-2-artigen Proteine hemmen (die Aktivierung der Proteine Bax/Bak wird genauer im Abschnitt 1.1.3 beschrieben) (Willis und Adams 2005). So entsteht eine Verbindung zwischen dem Rezeptor-vermittelten und dem mitochondrialen apoptotischen Signaltransduktionsweg.



**Abbildung 1: Zwei Signaltransduktionswege, extrinsischer (Rezeptor-vermittelter) und intrinsischer (mitochondrialer) Weg, die während der Apoptose eingeschaltet werden können.**

Auf der einen Seite führt die Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor zur Rekrutierung des Adaptorproteins FADD und zur weiteren Bildung des Proteinkomplexes DISC. Dabei werden die Initiatorcaspasen 8 bzw. 10 autoaktiviert, was zur Caspase-3-Aktivierung und zur Apoptose führt. Auf der anderen Seite können zahlreiche proapoptische Stimuli (wie UV-Licht oder Wachstumsfaktorentzug) die BH3-only Proteine aktivieren. Diese können die Effektoren Bak/Bax an den Mitochondrien aktivieren. Die pro-apoptischen Eigenschaften der Effektoren können durch die anti-apoptischen Bcl-2-artigen Proteine verhindert werden. Falls es zur Aktivierung von Bak/Bax kommt, wird die mitochondriale Außenmembran zerstört und die „apoptogenen“ Agenzien (u. a. Cytochrom c) aus dem Intermembranbereich der Mitochondrien freigesetzt. Dies führt zur Bildung des Apoptosoms und der daraus folgenden Aktivierung der Caspase-9, welche wiederum Caspase-3 spalten kann. In den sogenannten Typ II-Zellen wird der extrinsische und intrinsische Weg über das BH3-only Protein Bid verbunden. Die aktive Caspase-8 führt dabei zur Entstehung von tBid, welches wiederum die Bax/Bak Proteine und folglich den mitochondrialen Weg aktivieren kann. Modifiziert nach (Ashkenazi 2002; Danial und Korsmeyer 2004; Strasser 2005; Johnstone *et al.* 2008).

### 1.1.2.2 Der intrinsische Signaltransduktionsweg

Der intrinsische oder mitochondriale apoptotische Signaltransduktionsweg wird durch die Proteine aus der Bcl-2-Familie kontrolliert (Abbildung 1, rechts). Durch verschiedene extra- oder intrazelluläre Stresstimuli wie Zytokin-, Wachstumsfaktorentzug, Hypoxie oder DNA-Schäden werden die pro-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, die sogenannten BH3-only Proteine, induziert oder aktiviert (Cory *et al.* 2003; Strasser 2005; Youle und Strasser 2008). Sie besitzen die Fähigkeit, die anderen pro-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-

Familie Bax und Bak direkt bzw. indirekt (d.h. durch die Hemmung der anti-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie) zu aktivieren (Cheng *et al.* 2001; Zong *et al.* 2001; Letai *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005). Aktives Bak und Bax oligomerisiert an der mitochondrialen Außenmembran und führen zu deren Permeabilisierung (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Kuwana *et al.* 2002; Newmeyer und Ferguson-Miller 2003). Verschiedene pro-apoptische Komponenten wie Smac/DIABLO (Du *et al.* 2000; Verhagen *et al.* 2000), Omi/HtrA2 (Suzuki *et al.* 2001) und Cytochrom *c* (Liu *et al.* 1996; Kluck *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997), werden folglich aus dem Intermembranbereich (IMS, *intermembrane space*) in das Zytoplasma freigesetzt. Es kommt zur Bildung von einem Proteinkomplex, dem sogenannten Apoptosom (Acehan *et al.* 2002), der die Aktivierung von Caspase-9 ermöglicht. Dabei bindet das Cytochrom *c* an das zytoplasmatische Protein Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) und führt zu dessen Konformationsänderung. Dies erlaubt die ATP/dATP-abhängige Bindung von Caspase-9 an Apaf-1, welche über deren CARD(*caspase recruitment domain*)-Domänen erfolgt (Shi 2006). Durch die Bildung des heptamerischen Apoptosomrings wird die Procaspase-9 gespalten und aktiviert (Li *et al.* 1997). In Folge werden Effektorcaspasen eingeschaltet und Apoptose wird vollzogen. Die Aktivierung der Caspase-9 via Apaf-1 ist für den erfolgreichen Zelltod der neuronalen Zellen sowie Fibroblasten notwendig (Hao *et al.* 2005). Eine andere Möglichkeit, die Caspasen während der mitochondrialen Apoptose unabhängig von der Apoptosomentstehung zu induzieren, ist die Hemmung deren Inhibitoren IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) (Crook *et al.* 1993; Roy *et al.* 1995). Es wurde mehrfach berichtet, dass die zellulären IAPs die Fähigkeit besitzen, die proteolytische Aktivität verschiedener Caspasen durch deren BIR(*baculovirus IAP repeat*)-Domänen zu inhibieren (Salvesen und Duckett 2002; Srinivasula und Ashwell 2008). Das bereits erwähnte mitochondriale Protein Smac/DIABLO kann die anti-apoptischen Eigenschaften der IAPs blockieren (Du *et al.* 2000; Verhagen *et al.* 2000) und somit die Caspaseninduktion vorantreiben. Allerdings lassen sich diese Aussagen nicht für alle IAPs generalisieren, da die Mitglieder der IAP-Familie viele andere molekulare Funktionen, nicht nur während der Apoptose, ausüben (Salvesen und Duckett 2002; Srinivasula und Ashwell 2008) (s. Abschnitt 1.1.4).

### 1.1.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Das *Bcl-2*-Gen wurde von Tsujimoto und Kollegen durch die Klonierung der flankierenden Regionen einer Bruchstelle am Chromosom 18 bei den Patientenproben mit der folliculären B-Zell-Lymphoma entdeckt (Tsujimoto *et al.* 1985). Die Wissenschaftler berichteten, dass eine chromosomale Translokation t(14;18) von *Bcl-2*, zu einer Überexpression des Proteins geführt hat, indem es zur Kopplung mit dem Genlocus der schweren Kette des Immunglobulins gekommen ist (Bakhshi *et al.* 1985; Tsujimoto *et al.* 1985; Cleary *et al.*

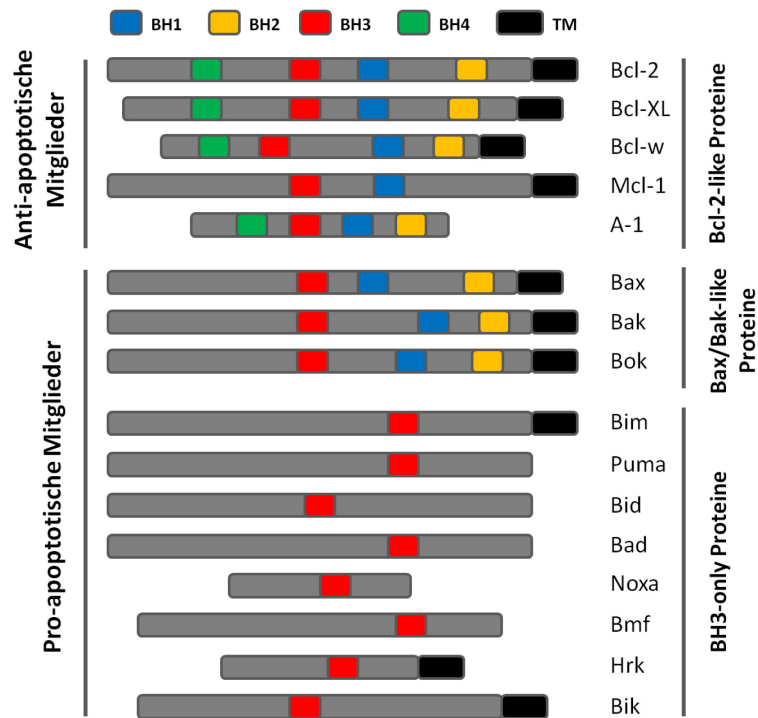
1986). Weitere Untersuchungen haben überraschenderweise gezeigt, dass das neu entdeckte Bcl-2-Protein nicht wie alle bisher bekannten Onkogene die Proliferation der Zelle ankurbelt, sondern Apoptose verhindert (Vaux et al. 1988).

Mittlerweile besteht die Bcl-2-Familie aus mindestens zwanzig humanen Proteinen, woraus die wichtigsten in der Abbildung 2 schematisch dargestellt sind. Wie bereits erwähnt, kontrollieren diese den mitochondrialen Apoptoseweg, indem sie die Cytochrom c-Freisetzung regulieren. Die Interaktionen zwischen den pro- und den anti-apoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern entscheiden über die apoptotischen Ereignisse in der Zelle (Cory et al. 2003; Strasser 2005; Youle und Strasser 2008).

### 1.1.3.1 Die Struktur

Alle Mitglieder der Proteinfamilie verfügen über eine bis vier BH(Bcl-2-Homologie)-Domänen. Die anti-apoptischen Proteine wie Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1 und Bcl-2 selbst werden durch ihre sequentielle, strukturelle, aber vor allem funktionelle Ähnlichkeit mit dem ersten entdeckten Mitglied auch „Bcl-2-artig“ genannt. Sie besitzen alle vier BH-Regionen (eine Ausnahme ist hier das Protein Mcl-1) und schützen die Zelle vor vielen zytotoxischen Stimuli wie Zytokinenzug, UV-Strahlung oder Chemotherapeutika (Vaux et al. 1988; Huang et al. 1997).

Die pro-apoptischen Angehörigen der Bcl-2-Familie lassen sich weiter in die sogenannten Bax/Bak-artigen und die BH3-only Proteine unterteilen. Auch wenn diese zwei Subgruppen die Apoptose positiv beeinflussen, haben sie dennoch unterschiedliche molekulare Funktionen. Die Proteine Bax und Bak (und evtl. das wenig erforschte Bok) ähneln in der Sequenz und Struktur den Bcl-2-artigen Mitgliedern (Suzuki et al. 2000) und besitzen drei der vier definierten BH-Domänen. Die BH3-only Proteine wie Bim, Puma, Noxa, Bid oder Bad besitzen dagegen nur das BH3-Motiv (Zha et al. 1996) und weisen außerdem wenige sequentielle oder strukturelle Gemeinsamkeiten weder untereinander noch mit den anderen Angehörigen der Bcl-2-Familie auf (Bid gilt hier als Ausnahme). Zudem während die Bax und Bak direkt auf der mitochondrialen Ebene für die Permeabilisierung der Außenmembran verantwortlich sind (Newmeyer und Ferguson-Miller 2003), fungieren die BH3-only Proteine als Sensibilisatoren, welche die Stressstimuli an diese Effektoren weitergeben (Cheng et al. 2001; Zong et al. 2001).



**Abbildung 2: Die wichtigsten Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie.**

Die Abbildung zeigt die vereinfachte Struktur der Proteine (links N-Termini, rechts C-Termini) sowie die Gruppierung nach deren Funktion. BH = Bcl-2-Homologiedomäne, TM = Transmembrandomäne. Modifiziert nach (Strasser 2005; Youle und Strasser 2008).

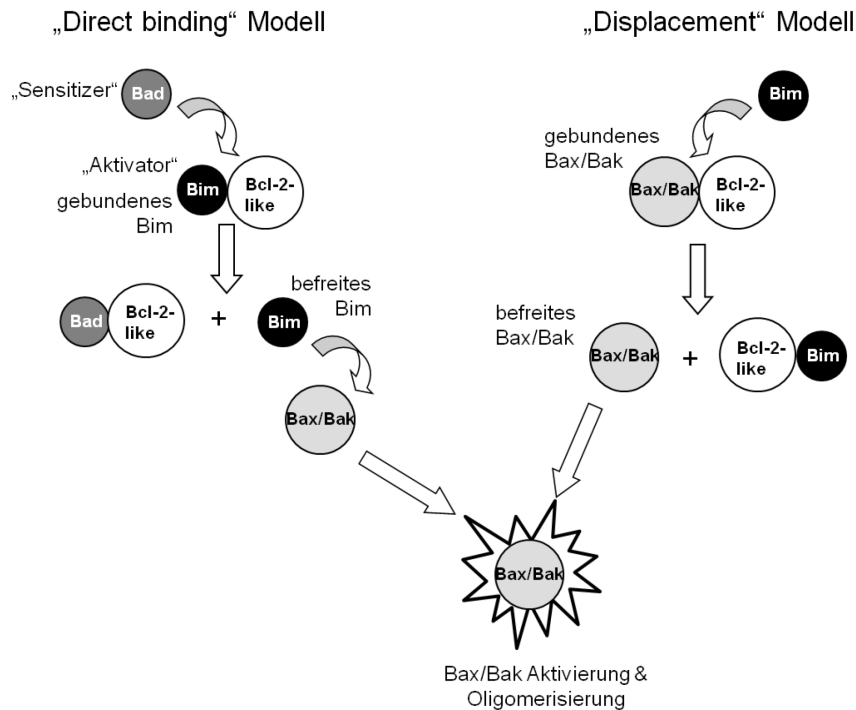
Die bisherigen Röntgenstruktur- und NMR-Studien haben sieben Proteine aus der Bcl-2-Familie mit einer sehr ähnlichen 3D-Struktur zeigen können. Faszinierenderweise gehören diese Proteine zu der pro-apoptotischen (die Effektoren Bax (Suzuki et al. 2000), Bak (Moldoveanu et al. 2006) und das BH3-only Protein Bid (Chou et al. 1999; McDonnell et al. 1999)) sowie zu der anti-apoptotischen (Bcl-x<sub>L</sub> (Muchmore et al. 1996), Bcl-2 (Petros et al. 2001), Bcl-w (Denisov et al. 2003; Hinds et al. 2003) und Mcl-1 (Day et al. 2005)) Subgruppe der Bcl-2-Familie. Sie alle bestehen aus einem Bündel aus  $\alpha$ -Helices, wo zwei vornehmlich hydrophobe Haupthelices von amphipatischen Helices umgeben sind. Die konservierten BH-Domänen 1, 2 und 3 bilden eine hydrophobe Tasche, wo das BH3-Motiv der BH3-only Proteine (Petros et al. 2000; Liu et al. 2003) oder der anderen Multidomänen-Bcl-2-Mitglieder andocken kann (Sattler et al. 1997). Am C-terminalen Ende der sieben erwähnten Proteine befindet sich eine hydrophobe Transmembrandomäne (Abbildung 2), die im zytosolischen Milieu die eigene hydrophobe BH1/2/3-Furche besetzt. Auch wenn Bid keinen Transmembrananker besitzt, kann es mit einer C-terminalen alpha-Helix in Membranen integrieren und ihre Permeabilisierung durch Bax verursachen (Lovell et al. 2008). Auch manche BH3-only Proteine haben eine Transmembrandomäne (Abbildung 2), wodurch das Membrantargeting ermöglicht wird. Es ist immer noch unklar, ob das BH3-only Protein Puma in die mitochondriale Membran integrieren kann; die Experimente unserer Arbeitsgruppe

weisen sowohl eine Transmembransequenz als auch eine C-terminale mitochondriale Importsequenz von Puma auf (Wilfling *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Die Proteine der Bcl-2-Familie kommen nicht nur in der mitochondrialen, sondern auch in den anderen Membranen und im Zytosol vor. Bcl-2 wurde beispielsweise hauptsächlich an den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Zellkernhülle lokalisiert (Nguyen *et al.* 1993; Lithgow *et al.* 1994). Die anderen anti-apoptotischen Multidomänen-Proteine Bcl-w, Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 sind teilweise im Zytosol und teilweise an den mitochondrialen Membranen zu finden (Hsu *et al.* 1997; Hausmann *et al.* 2000; Nijhawan *et al.* 2003; Wilson-Annan *et al.* 2003). Obwohl beide Bak und Bax als Effektoren die gleiche Funktion bei MOMP haben, unterscheiden sie sich deutlich in ihrer subzellulären Lokalisation. Während sich Bak bereits an der mitochondrialen (und ER-) Außenmembran befindet, kommt Bax dagegen in einer gesunden Zelle vornehmlich in seiner zytosolischen Form vor und muss für die Permeabilisierung der Mitochondrien aktiviert und transportiert werden (Hacker und Weber 2007).

#### 1.1.3.2 Die Aktivierung

Die Frage der Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine, die zur Freisetzung des Cytochroms c und weiter zur Initialisierung der Caspasenkaskade führen, ist einer der wichtigsten Zielpunkte der Apoptoseforschung geworden. Es ist immer noch unklar, wie die BH3-only Proteine die Effektoren aktivieren, aber auch wie genau die Effektoren die mitochondriale Außenmembran permeabilisieren (Willis und Adams 2005; Chipuk *et al.* 2006; Hacker und Weber 2007; Chipuk und Green 2008). Es wurde gezeigt, dass Bax, aber auch die anti-apoptotische Multidomänen-Proteine wie bspw. Bcl-x<sub>L</sub> Poren in der Außenmembran der Mitochondrien bilden können (Antonsson *et al.* 1997; Minn *et al.* 1997). Bevor das geschieht, kommt es zur Konformationsänderung (Hsu und Youle 1998; Griffiths *et al.* 1999; Griffiths *et al.* 2001) und Oligomerisierung (Antonsson *et al.* 2001; Nechushtan *et al.* 2001) von Bak/Bax an den Mitochondrien, wobei das letzte durch die Überexpression von Bcl-2 verhindert werden kann (Mikhailov *et al.* 2001).



**Abbildung 3: Zwei mögliche Mechanismen für die Aktivierung von Effektoren Bax/Bak.**

Nach dem „Direct binding“ Prinzip können die starken Killer BH3-only Proteine (z. B. Bim), welche an die Effektoren gebunden sind, durch die sogenannten „Sensitizer“ (z. B. Bad) befreit werden. In der Folge können die befreiten „Aktivatoren“ die Effektoren Bax/Bak direkt aktivieren. In dem „Displacement Modell“ dagegen sind die Effektoren (vor allem Bak) an die Bcl-2 Mitglieder gebunden und werden dadurch inaktiv gehalten. Nach der Bindung der aktivierten BH3-only Proteine werden die anti-apoptotischen Proteine neutralisiert, was folglich zur Autoaktivierung von Effektoren führt. Modifiziert nach (Willis und Adams 2005).

Es werden hauptsächlich zwei Modelle (Abbildung 3) zur Aktivierung von Bak/Bax durch die BH3-only Proteine in der Literatur lebhaft diskutiert. Der erste Vorschlag kam von der Arbeitsgruppe um Stanley Korsmeyer aus USA (Letai *et al.* 2002). In dem „direct binding“ Modell (Abbildung 3, links) teilen die Wissenschaftler die BH3-only Proteine bzw. dessen BH3-Motive in die sogenannten „Bid-artigen“ und die „Bad-artigen“ ein. Die Bid-artigen Peptide, zu denen nur die BH3-Domänen von Bim und Bid selbst gehören, sind in der Lage Bax und Bak direkt zu aktivieren und werden somit auch als „Aktivatoren“ bezeichnet. In der räumlichen Nähe von den Bcl-2-artigen Proteinen werden die Aktivatoren allerdings durch die anti-apoptotischen Mitglieder abgefangen. Die Bad-artigen Peptide, welche durch die BH3-Motive von Bad oder Bik repräsentiert sind, können alleine keine Effektorproteine induzieren. Dennoch sensibilisieren sie die Mitochondrien, indem sie die Bcl-2-artige Mitglieder binden, und werden deshalb auch „Sensitizer“ genannt. Die gebundenen Aktivatoren brauchen folglich die Einwirkung der Sensitizer um von den Bcl-2-artigen Proteinen befreit zu werden und die Bax/Bak zu aktivieren (Letai *et al.* 2002). Das Modell wurde von der gleichen Arbeitsgruppe weiterentwickelt, die vier Jahre später ergänzende Ergebnisse publiziert hat (Certo *et al.* 2006). Die Wissenschaftler haben diesmal alle anti-

apoptotischen Proteine und deren Bindung an die BH3-Peptide untersucht. Eine Überlebensabhängigkeit der Zelle von einem anti-apoptotischen Protein, die sich durch die Bindungskorrelation zwischen ihm und den Sensitizern bestimmen lässt, wurde als „BH3-Profiling“ bezeichnet. Man kann zwischen der Bcl-2 und der Mcl-1-Abhängigkeit der Zelle unterscheiden. Außerdem wurde ein neues Stadium „präpariert für den Tod“ (*primed for death*) eingeführt, welches die Zelle zwischen dem apoptotischen und dem gesunden Zustand positioniert. Certo und Kollegen schlagen vor, dass bei den Zellen, die nicht für den Tod präpariert sind, die Sensitizer alleine keine Apoptose auslösen können. In den präparierten Zellen dagegen sind die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie durch die Aktivatoren bereits gebunden und können somit die Effektoren aktivieren, sobald sie von den Sensitizern in der hydrophoben Tasche deplatziert werden. Die Präparation der Mitochondrien bzw. Zellen geschieht oft durch die Anregung der Zelle mit den apoptogenen Stimuli wie Zytokinentzug (IL-3-Entzug bei FL5.12-BCL-2 Zellen) oder entsteht ohne experimentelle externe Intervention durch den malignen Phenotyp der Zelle bspw. in murinen Bcl-2-abhängigen Leukämiezellen.

Das alternative Modell zur Bax/Bak-Aktivierung wurde als das „Displacement“ Modell (Abbildung 3, rechts) bezeichnet und von einer australischen Arbeitsgruppe um David Huang vorgeschlagen (Chen *et al.* 2005). In diesem Fall basiert die Aktivierung der Effektoren alleine auf der Neutralisation der Bcl-2-artigen Proteine durch die BH3-only Mitglieder. Die Bindung und somit die Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine durch die BH3-only Proteine reicht aus, um Bax/Bak zu befreien. Es folgen Oligomerisierung und Autoaktivierung der Effektoren ohne direkten Kontakt mit den BH3-only Mitgliedern. Allerdings binden die BH3-Motive die Bcl-2-artigen Proteine unterschiedlich stark. Bei den pro-apoptotischen Mitgliedern kann man, laut Chen und Kollegen, zwischen den nicht-selektiven oder potenten Binder und den selektiven oder schwachen Binder unterscheiden. Diese Trennung basiert auf dem Bindungsmuster der BH3-Domänen der BH3-only Proteine und ist vereinfacht in der Abbildung 4 dargestellt. Die BH3-Peptide von Bim oder Puma können alle anti-apoptotischen Multidomänen-Proteine binden und fungieren somit als starke Killer. Die selektiven Binder wie Bad, Bmf oder Noxa können dagegen nur an bestimmte Bcl-2-artigen Proteine andocken und führen deshalb nur zum relativ schwachen Zelltod. Im Vergleich zu dem „Direct binding“ Modell können in diesem Fall die schwachen (Sensitizer) auch ohne die starken Killer (Aktivatoren) auskommen, so lange alle anti-apoptotischen Proteine neutralisiert sind. Folglich kann die Kombination von bspw. Noxa (neutralisiert Mcl-1 und A1) und Bad (bindet Bcl-2, -w und -x<sub>L</sub>) erfolgreich Apoptose auslösen, was auch Bim oder Puma alleine erzielen könnten (Willis *et al.* 2005).

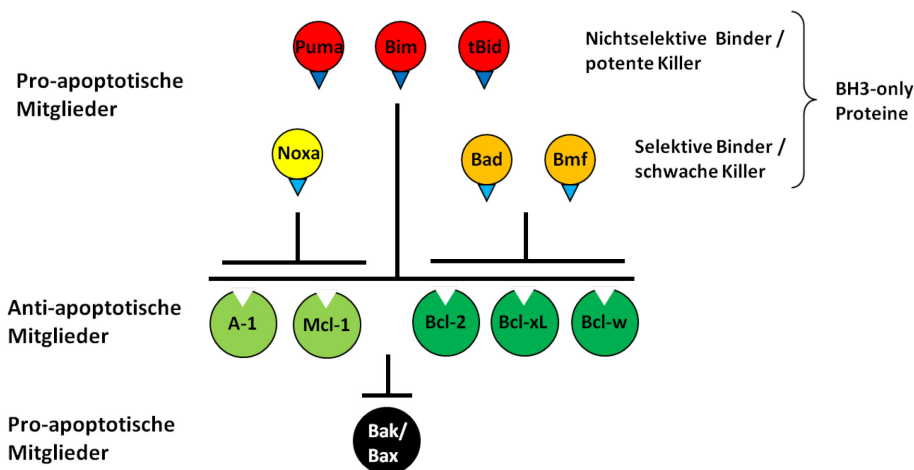
Beide Modelle haben ihre Stärken und Schwächen und wurden durch mehrere Studien sowohl bestätigt als auch abgelehnt. Das „direct binding“ Modell (Letai *et al.* 2002) wurde in



einem zellfreien System durchgeführt, was die Frage hervorruft, ob das gleiche in einem zellulären Milieu passieren würde. Zusätzlich wurden hier keine Gesamtlängeproteine sondern viel kürzere BH3-Motive der BH3-only Proteine verwendet, welche eventuell andere Bindungseigenschaften besitzen könnten. Allerdings basieren die Bindungsexperimente des alternativen Modells von Chen *et al.* auch auf den kurzen BH3-Peptiden.

Das „direct binding“ Modell schließt Puma aus dem Kreis der Aktivatoren aus. Dies kommt von der Beobachtung, dass das korrespondierende BH3-Peptid kein Cytochrom *c* aus den Mitochondrien freisetzen bzw. kein Bax aktivieren und zur Permeabilisation der Liposomen führen kann (Letai *et al.* 2002; Kuwana *et al.* 2005; Certo *et al.* 2006). Es gab allerdings Studien, die einen starken Beweis für Puma als Aktivator liefern, da sie über die Bindung von Puma an Bax (Cartron *et al.* 2004) oder auch über die Freisetzung von Cytochrom *c* aus isolierten Mitochondrien durch das Protein berichteten (Kim *et al.* 2006). Das alternative „Displacement“ Modell sieht Puma als einen starken Killer, da das PumaBH3-Peptid alle anti-apoptotischen Mitglieder binden und darüber hinaus die virale Überexpression des Gesamtlängeproteins sehr effektiv den Zelltod in den MEF(*mouse embryonic fibroblasts*)-Zellen hervorrufen kann (Chen *et al.* 2005).

Aber nicht nur Puma soll die Effektoren beeinflussen können. Es wurde neuerdings ein Vorschlag gemacht, dass auch andere BH3-only Peptide als Bim oder Bid Cytochrom *c* aus den Mitochondrien und folglich Apoptose auslösen können. Die BH3-Domänen von Noxa sowie Bmf sollen auch in Abwesenheit von den starken Killern wie Bim und Bid die Effektorvermittelte Apoptose zu induzieren (Du *et al.* 2011).



**Abbildung 4: Bindungsmuster für die BH3-only Proteine und deren Targets Bcl-2-artige Mitglieder.**

Die Aktivierung von Effektoren Bax/Bak kann nur nach der Neutralisation von allen anti-apoptotischen Mitgliedern stattfinden. Die nichtselektiven Binder wie Bim, tBid oder Puma können alle anti-apoptotischen Mitglieder binden und somit alleine die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran erfolgreich vorantreiben. Die selektiven Binder wie Noxa oder Bad können nur ein Teil der anti-apoptotischen Mitglieder binden und müssen somit zusammenarbeiten um alle Bcl-2-artige Proteine zu neutralisieren. Modifiziert nach (Chen *et al.* 2005; Willis und Adams 2005).

Nicht nur deshalb weisen beide Modelle gewisse „Lücken“ auf. Das „amerikanische“ Modell der Arbeitsgruppe aus Boston erklärt nicht, wieso die Kombination von Noxa und Bad in vielen Fällen zur Freisetzung vom Cytochrom c aus den Mitochondrien oder zum Zelltod führen konnte (Chen *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006; Weber *et al.* 2009). Nach dem „direct binding“ Modell könnte alleine die Zusammenarbeit von zwei Sensitizern und ohne Anwesenheit der Aktivatoren unmöglich solche Auswirkung haben. Das Hauptproblem des „direct binding“ Modells ist aber, dass die Bindung von den Aktivatoren an die Effektor Proteine Bax/Bak bisher nicht überzeugend gezeigt wurde. Nur in Gegenwart von nicht-ionischen Detergentien (Triton-X100 oder Octylglucosid), welche die Konformation von Bax ändern (Hsu und Youle 1998), ist es gelungen, eine schwache Bindung von Bim an Bax nachzuweisen (Willis *et al.* 2007). Eine andere Studie hat von der Interaktion zwischen dem gleichen Proteinpaaar berichtet, allerdings von der Bim<sub>S</sub> Splicevariante, die zwar apoptotisch sehr potent ist, wird aber unter physiologischen Bedingungen in der Zelle kaum exprimiert (Marani *et al.* 2002). Auch die Bindung von dem Aktivator Bid an Bax/Bak wurde untersucht. In vitro Immunopräzipitationsexperimente mit tBid und Bak bzw. Bax haben eine Interaktion gezeigt (Wang *et al.* 1996; Wei *et al.* 2000). Nichtsdestotrotz bleibt es offen, ob die BH3-only Proteine an die Effektoren tatsächlich binden können, da ein glaubwürdiger Nachweis sehr schwer ist. Deshalb vielleicht wird für die Aktivierung der Effektoren durch die BH3-only Proteine ein Mechanismus nach dem Prinzip „hit-and-run“ vorgeschlagen, da tBid nach dem Anstoßen vom Bax und dessen ausgelöster Oligomerisierung nicht mehr in dem Komplex nachweisbar ist (Wei *et al.* 2000).

Auch das „australische“ Modell der Arbeitsgruppe aus Melbourne ist nicht ganz zufriedenstellend. Der Schwerpunkt der bestätigenden Studien liegt hauptsächlich bei Bak nicht Bax. Es wurde gezeigt, dass Bak in den gesunden Zellen an den Mitochondrien lokalisiert ist und dort durch zwei anti-apoptotische Proteine Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> gebunden und somit inaktiv gehalten wird (Willis *et al.* 2005). Sobald ein starker Killer wie Bim oder zwei schwächere Killer wie Noxa und Bad, welche entsprechend Mcl-1 sowie Bcl-x<sub>L</sub> binden können, wird Bak an den Mitochondrien befreit, aktiviert und verursacht Permeabilisierung deren Außenmembran. Es wurde zusätzlich postuliert, dass weder Bcl-2 noch ein anderes anti-apoptotisches Mitglied an der Bindung von Bak beteiligt ist. Für Bax wurde in einer weiteren Studie ein Vorschlag gemacht, es sei möglicherweise durch die vier anti-apoptotischen Proteine Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w gebunden (Willis *et al.* 2007). Da sich Bax normalerweise in einem inaktiven Zustand im Zytosol befindet, muss es für die Auslösung der Apoptose erst an die Mitochondrien transportiert werden. Die Bax-Aktivierungsstudien, die hauptsächlich in einem zellfreien System durchgeführt worden sind, ignorierten meistens diese wichtige Tatsache. Deshalb ist es bis jetzt unklar was die Bax-Translokation steuern könnte (diskutiert in (Paschen *et al.* 2007)).

Dass die mitochondriale Translokation und Lokalisation der BH3-only Proteine eine sehr wichtige Rolle während des apoptotischen Vorgangs spielt, haben Weber und Kollegen gezeigt (Weber *et al.* 2007). In der Studie wird postuliert, dass die Insertion von Bim<sub>S</sub> in die mitochondriale Außenmembran essenziell für die Auslösung der Bax-vermittelten Apoptose ist. Eine Bim<sub>S</sub>-Mutante, welche keine Transmembrandomäne besitzt, verlor ihre apoptoseinduzierende Fähigkeiten. Diese konnten durch die Ersetzung der Transmembrandomäne durch einen Transmembrananker aus der Hefe teilweise wieder hergestellt werden. Gleichzeitig wird postuliert, dass die Bindung der kurzen Splicevariante von Bim an die Bcl-2-artigen Proteine für die Bax-Aktivierung nicht notwendig ist. Diese Beobachtung wurde mit einer anderen Bim<sub>S</sub>-Mutante überprüft, die weder Bcl-2 noch Mcl-1 bindet, sich aber in der mitochondrialen Fraktion befindet und apoptotisch erfolgreich ist (Weber *et al.* 2007).

### 1.1.3.3 Die Regulation

Wie bereits beschrieben, werden die Interaktionen zwischen den Effektoren, den Bcl-2-artigen Mitgliedern und den BH3-only Proteinen intensiv untersucht. Um das gewünschte Gleichgewicht zwischen der Apoptose und dem Überleben der Zelle zu behalten, müssen diese drei Subgruppen der Bcl-2-Familie sorgfältig reguliert werden. Die Regulation der BH3-only Proteine Noxa, Puma und Bim kann beispielsweise auf der transkriptionellen Ebene erfolgen. Beide Noxa und Puma werden nach der Aktivierung des Tumorsuppressors p53, der eine essentielle Rolle nach der Schädigung der DNA spielt, exprimiert (Oda *et al.* 2000; Nakano und Vousden 2001; Yu *et al.* 2001; Shibue *et al.* 2003). Wie bereits erwähnt, wird Bid durch die proteolytische Spaltung durch die Caspase-8 zur seiner aktiven Form tBid gespalten (Li *et al.* 1998). Bim kann durch die Transkriptionsfaktoren FOXO3A (*the class O forkhead box transcription factor-3A*) nach Wachstumsfaktorenzug (Dijkers *et al.* 2000) und CEBP $\alpha$  (*CCAAT-enhancer binding protein- $\alpha$* ) oder CHOP (*CEBP homologous protein*) als Antwort auf ER-Stress (Puthalakath *et al.* 2007) induziert werden. Manche BH3-only Proteine werden über die post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierung reguliert. Bad zum Beispiel wird durch seine Dephosphorylierung in Antwort auf Wachstumsfaktorenzug aktiviert (Zha *et al.* 1996).

Die Phosphorylierung von Bim hat sich als komplizierter herausgestellt. Einerseits kann die Phosphorylierung durch die MAP-Kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) an drei Serin-Resten (S59, S69 und S104 in Menschen bzw. S55, S65 und S100 in der Maus) erfolgen und zur Ubiquitinierung und folglich zum proteasomalen Abbau des Proteins führen (Ley *et al.* 2003; Luciano *et al.* 2003; Harada *et al.* 2004). Andererseits kann die Phosphorylierung an der Serin 69 durch die MAP-Kinase JNK (*c-jun N-terminal kinase*) nach dem Entzug der Wachstumsfaktoren in manchen Neuronen zur Induktion der Apoptose beitragen (Putcha *et al.* 2003). In Osteoklasten wird die Ubiquitinierung von Bim als Folge

des Wachstumsfaktorenzugs reduziert, was die Proteinmenge erhöht und zur Apoptose führt (Akiyama *et al.* 2003). Außerdem können Bim und Bmf durch Strukturen des Zytoskeletts gebunden und somit in Schach gehalten werden. Bim müsste für seine Aktivierung von Dyneins leichte Kette (DLC1/LC8) aus dem Dynein-Motor-Komplex (Puthalakath *et al.* 1999) und Bmf von DLC2 aus dem Myosin-V-Motor-Komplex befreit werden (Puthalakath *et al.* 2001). Während die Behandlung mit Paclitaxel (Taxol; einem mitotischen Inhibitor, der auf Mikrotubuli wirkt) nur Bim vom Zytoskelett löst, wird durch Anoikis (Zelltod hervorgerufen durch den Verlust des Kontakts zwischen der Zelle und der umgebenden Extrazellulären Matrix) nur Bmf befreit (Puthalakath *et al.* 2001). Durch UV-Strahlung werden dagegen beide BH3-only Proteine Bim und Bmf von den Motor-Komplexen gelöst, indem das DLC-Bindungsmotiv durch JNK phosphoryliert wird (Lei und Davis 2003). Eine andere Studie konnte dagegen keine Änderung in der Bindung von Bim an die Zytoskelettelemente als Folge der ERK-abhängigen Phosphorylierung des Proteins beobachten (Hacker *et al.* 2006). Die Korrelation zwischen der Bim-Phosphorylierung und seiner Bindung an die Dyneins leichte Kette hängt im Wesentlichen von der Splicevariante des Proteins ab. Bim kann zu mindestens drei verschiedenen Isoformen gespliced werden. Die bekanntesten und meist untersuchten sind Bim<sub>EL</sub> (*extra long*), Bim<sub>L</sub> (*long*) und das bereits erwähnte Bim<sub>S</sub> (*short*) (O'Connor *et al.* 1998). Die kürzeste Isoform Bim<sub>S</sub> besitzt keine DLC-Bindungsstelle und ist eventuell deshalb apoptotisch sehr potent. Die extra-lange Variante besitzt, im Vergleich zu den kürzeren Isoformen zusätzlich eine ERK-Dockingdomäne und -Phosphorylierungsstelle und kann durch ERK phosphoryliert und somit für den Proteasom-abhängigen Abbau bestimmt werden (Ley *et al.* 2005).

Auch die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie können transkriptionell und post-translationell reguliert werden. Die Transkription von Bcl-x<sub>L</sub> wird zum Beispiel über den JAK/STAT(*the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*)-Signaltransduktionsweg als Folge der Wirkung von Wachstumsfaktoren induziert (Grad *et al.* 2000). Mcl-1 ist ein Protein mit rapidem Umsatz, welcher über die proteasomale Degradation erfolgt und teilweise als Antwort auf Zytokinenzug oder andere pro-apoptotische Stimuli wie bspw. UV-Strahlung forciert wird (Hershko und Ciechanover 1998; Nijhawan *et al.* 2003). Das BH3-only Protein Noxa und die E3-Ubiquitin-Ligase Mule (*Mcl-1 ubiquitin ligase E3*; auch ARF-BP1 genannt) können über deren Bindung für den Abbau von Mcl-1 verantwortlich sein (Willis *et al.* 2005; Zhong *et al.* 2005). Kürzlich wurde eine Deubiquitinase USP9X beschrieben, welche die Poly-Ubiquitin-Ketten von Mcl-1 entfernt und im Gegensatz die Stabilisierung des Proteins verursacht (Schwickart *et al.* 2010)

#### 1.1.3.4 Die physiologische Rolle der Bcl-2-Familienmitglieder

Eine falsche Regulation des Proteins bzw. der Verlust oder eine Mutation des korrespondierenden Gens können eine wichtige Informationsquelle über die physiologische

Rolle des Eiweißes sein. Die zahlreichen Versuche *in vivo* mit den Mausmodellen bzw. KO-Mäusen sowie *in vitro* mit den murinen bzw. humanen Zellen, haben eine Reihe von interessanten und hilfreichen Ergebnissen bzgl. der Bedeutung der Bcl-2-Proteinfamilie geliefert.

Nachdem die Effektoren Bax und Bak für die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran direkt verantwortlich sind, ist es keine Überraschung, dass Bak/Bax Doppel-Knockout(DKO)-Zellen eine Resistenz gegenüber den meisten intrinsischen apoptotischen Stimuli aufweisen (Wei *et al.* 2001). Sogar die Überexpression der BH3-only Proteine kann in Abwesenheit von Bax/Bak keine Apoptose auslösen (Cheng *et al.* 2001; Zong *et al.* 2001). Folglich zeichnen sich Bax/Bak-DKO-Mäuse durch verschiedene schwere Missbildungen, wie verbliebene Schwimmhäute zwischen den Fingern oder die Akkumulation der überschüssigen Zellen im hematopoietischem System und zentralem Nervensystem, aus. Die Mehrzahl dieser Föten stirbt schon während der Entwicklung und weniger als 10 % der Tiere überleben bis zum Erwachsenenalter. Allerdings ist die Entstehung wichtiger Organe wie Lunge, Herz oder Leber in den Bax/Bak-DKO-Mäuse unbeeinträchtigt (Lindsten *et al.* 2000). Die Entwicklung der Bax- oder Bak-Einfach-KO-Mäusen verläuft meist normal und zeichnet sich durch kleinere physiologische Defekte aus. Die Bax-KO-Mäuse weisen eine übermäßige Proliferation der Neuronen sowie eine leichte lymphoide Hyperplasie auf. Während die Fruchtbarkeit der Weibchen normal zu sein scheint, sind die Männchen durch eine defekte Differenzierung der Spermien unfruchtbar (Knudson *et al.* 1995). Dies ist nicht der Fall in den Bak-KO-Tieren, die außer einer verlängerten Lebensdauer von Thrombozyten (Mason *et al.* 2007) nur sehr wenige Anomalien zeigen (Lindsten *et al.* 2000).

Für eine fehlerfreie Embryogenese sind allerdings auch die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie wichtig. Vor allem Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> spielen dabei eine herausragende Rolle. Während die Bcl-x-KO-Mausembryos nur bis zum 13,5. Entwicklungstag überleben (Motoyama *et al.* 1995), sterben die Mausembryos ohne die beiden Mcl-1-Allele sogar schon im Blastozystenstadium (Rinkenberger *et al.* 2000). Normale Entwicklung ist dagegen bei den Bcl-w-defizienten Mäusen, mit Ausnahme der Unfruchtbarkeit der Männchen, zu beobachten (Print *et al.* 1998). Auch Bcl-2-KO-Tiere überleben das embryonale Stadium, weisen aber einige Entwicklungsfehler (bspw. eine rasche Apoptose der Zellen des lymphatischen Systems oder hypopigmentierte Haare) auf und sterben letztlich an einer polyzystischen Nierenerkrankung 4 bis 8 Wochen nach der Geburt (Veis *et al.* 1993). Eine erhöhte Apoptose der Mastzellen (Xiang *et al.* 2001) und Granulozyten (Hamasaki *et al.* 1998) wurde in Mäusen mit dem ausgeschalteten A1A-Gen beobachtet (im Vergleich zum Mensch besitzt die Maus nicht nur ein sondern vier A1-Gene).

Auch das BH3-only Protein Bim spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose von Granulozyten (Villunger *et al.* 2003) und Mastzellen (Alfredsson *et al.* 2005), aber auch bei anderen

Zelltypen wie Neuronen (Putchá *et al.* 2001; Whitfield *et al.* 2001) und Osteoklasten (Akiyama *et al.* 2003) als Folge des Wachstumsfaktorentzugs. Darüber hinaus haben Kirschnek und Kollegen gezeigt, dass die Phagozytose-induzierte Apoptose von Makrophagen als Folge der Bim-Hochregulation und –Aktivierung geschieht (Kirschnek *et al.* 2005). Ebenso wird die Apoptose der aktivierten T-Zellen, was folglich die Terminierung der T-Zell-abhängigen Immunantwort bedeutet, in Abhängigkeit von Bim ausgeführt (Hildeman *et al.* 2002; Pellegrini *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2006). Bim ist außerdem essentiell für die korrekte Entwicklung des Immunsystems, indem es für die Entfernung der autoreaktiven Lymphozyten verantwortlich ist (Bouillet *et al.* 2002; Enders *et al.* 2003). Die *gene-targeting* Studie hat gezeigt, dass Bim-defiziente Mäuse eine erhöhte Anzahl an lymphoiden und myeloiden Zellen haben und zusätzlich eine fatale SLE(systemic lupus erythematosus)-ähnliche Autoimmunkrankheit entwickeln (nur Mäuse mit dem gemischten C57BL/6 x 129SV genetischen Hintergrund) (Bouillet *et al.* 1999).

Im Gegensatz zu Bim, dessen Abwesenheit zu erheblichen Entwicklungsstörungen führt, hat die Defizienz des anderen starken Killers Bid nur eine geringe Auswirkung auf die embryonale Apoptose. Der Bid-Mangel wirkt sich allerdings unterschiedlich auf verschiedene Zelltypen aus. Während die Lymphozyten aus den Bid-defizienten Mäusen normale Sensitivität gegenüber dem Fas-Ligand besitzen, zeigen beispielsweise Hepatozyten oder Fibroblasten gewisse Resistenz gegenüber der Rezeptor-vermittelten Apoptose (Yin *et al.* 1999; Kaufmann *et al.* 2007).

Wie bereits erwähnt, sind die zwei BH3-only Proteine Puma und Noxa für die p53-vermittelte Apoptose verantwortlich. Interessanterweise führt die Induktion von p53 durch die Bestrahlung mit UV-Licht ausschließlich zur Aktivierung von Noxa, während  $\gamma$ -Bestrahlung Puma aktiviert (Erlacher *et al.* 2005; Naik *et al.* 2007). Zusätzlich ist Puma für die p53-unabhängige Apoptose essentiell, etwa bei der Behandlung mit Glucocorticoiden, Staurosporin oder Phorbol ester sowie beim Wachstumsfaktorentzug (Jeffers *et al.* 2003; Villunger *et al.* 2003). Ansonsten konnten in den Puma- oder Noxa-defizienten Mäusen keine gravierenden Auffälligkeiten beobachtet werden (Jeffers *et al.* 2003; Villunger *et al.* 2003).

In der Regel konnte die Potenz der BH3-only Proteine in den Mausmodellen bestätigt werden. Mäuse, denen die starken Killer wie Bim, Puma oder Bid fehlen, zeigen mehr Anomalitäten als Mäuse, die für die schwächeren BH3-only Proteine wie Bad, Bik oder Bmf defizient sind. Zusätzlich wurde eine funktionelle Überschneidung bestimmter BH3-only Proteine in den verschiedenen DKO-Mäusen gezeigt (diskutiert bspw. in (Youle und Strasser 2008)).

#### 1.1.3.5 Der Bcl-2-Antagonist ABT-737

Viele Tumorarten überexprimieren anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine und können somit dem apoptotischen Zelltod effizient entgehen (wie bspw. für Bcl-2 erforscht wurde (Tsuji moto *et*

*al.* 1985; Vaux *et al.* 1988)). Andere haben einen defekten Signaltransduktionsweg proximal der Bcl-2-Proteinfamilie (bspw. eine p53-Mutation) und können die pro-apoptischen Mitglieder nicht aktivieren und somit keine Apoptose in den transformierten Zellen auslösen. Die früheren Strategien zur Behandlung von Krebs basierten auf empirischen Daten bzw. der unspezifischen Aktivierung von Zelltod und waren deshalb oft erfolglos (bspw. die Monotherapie vom malignen Melanom mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Dacarbazin; diskutiert u. a. in (Ko und Fisher 2011); s. Kapitel 1.2.2). Eine neuere Anti-Tumor-Strategie ist die Auslösung der Apoptose durch die spezifische Hemmung der anti-apoptischen Proteine. Hierbei werden niedermolekulare Verbindungen, die sog. Bcl-2-Inhibitoren (eher irreführend auch BH3-Mimetika genannt) verwendet. Diese ahmen die BH3-Domäne der BH3-only Proteine nach, indem sie in die hydrophobe Tasche der Bcl-2-artigen Mitglieder hineinpassen und diese spezifisch blockieren können. Ein solcher Bcl-2-Inhibitor ist das kleine Molekül ABT-737, welches von Oltersdorf und Kollegen vorgestellt wurde (Oltersdorf *et al.* 2005). ABT-737 wurde mit einer SAR-by-NMR(*structure–activity relationship by nuclear magnetic resonance*)-Technologie entwickelt, die eine sehr effiziente Suchmethode für hoch-affine Protein-Liganden darstellt (Shuker *et al.* 1996). Das Bindungsspektrum von ABT-737 ist dem von BH3-only Protein Bad ähnlich; Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> sowie Bcl-w werden mit nanomolarer Affinität gebunden. Die anti-apoptischen Proteine Mcl-1 und A1 werden dagegen nur mit einer viel schwächeren Affinität (die sich in dem mikromolaren Bereich bewegt) gebunden und werden somit nicht inhibiert (Oltersdorf *et al.* 2005; Lee *et al.* 2007).

Im Gegensatz zu den anderen früher entwickelten Molekülen ist ABT-737 ein echter Bcl-2-Antagonist, da es in Abwesenheit von Bak und Bax keine Apoptose induzieren kann (van Delft *et al.* 2006). Allerdings muss, um den apoptotischen Zelltod auszulösen, die Neutralisierung vom Mcl-1 gewährleistet sein. Dies konnte bspw. durch die Verwendung von siRNA (Konopleva *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Lin *et al.* 2007; Weber *et al.* 2009; Zall *et al.* 2010), die Substanz Roscovitin (Chen *et al.* 2007) oder Interleukin-3(IL-3)-Entzug (van Delft *et al.* 2006) erreicht werden. Es konnte auch in zahlreichen Studien bestätigt werden, dass ABT-737 insbesondere in Zellen mit einem niedrigen Mcl-1-Proteinspiegel bzw. mit einer hohen Noxa-Aktivität seine Effizienz als Einzeltherapeutikum zeigt (Konopleva *et al.* 2006; van Delft *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Del Gaizo Moore *et al.* 2007; Lin *et al.* 2007). Schon Oltersdorf und Kollegen haben gezeigt, dass ABT-737 alleine hauptsächlich in nicht-soliden Tumoren, wie chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) oder follikulären Lymphomen aber auch in wenigen soliden Tumoren, wie dem kleinzelligen Lungenkarzinomen (*small-cell lung carcinoma*; SCLC) Apoptose auslösen kann (Oltersdorf *et al.* 2005).

Dagegen sind andere Tumorarten wie nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (*non small-cell lung carcinoma*; NSCLC) gegenüber dem Bcl-2-Inhibitor resistent, zeigen allerdings gewisse

Sensitivität, sobald mit anderen pro-apoptotischen Agenzien (z. B. Paclitaxel) kombiniert wird (Oltersdorf *et al.* 2005). Die Tatsache, dass ein niedriger Mcl-1-Proteinspiegel für die ABT-737-Sensibilität benötigt ist, wird in der Kombinationstherapie genutzt. Es wurde oft gezeigt, dass insbesondere diejenigen Chemotherapeutika, die den Proteinspiegel von Mcl-1 auf irgendeine Weise herunterregulieren, sich dafür am besten eignen. Cycloheximid (CHX), welches die Proteinbiosynthese von u. a. Mcl-1 inhibiert (van Delft *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007) oder Dacarbazin, ein DNA-alkylierendes Agent, das den Noxa-Proteinspiegel in Melanom-Zellen hochreguliert (Weber *et al.* 2009), sind nur einige Beispiele für die mögliche Kombinationstherapie mit ABT-737.

Seit der Entwicklung von ABT-737 im Jahr 2005 wurden mit dem Bcl-2-Inhibitor zahlreiche Studien zur Behandlung von Tumoren durchgeführt. Der Bcl-2-Antagonist wurde *in vitro* in vielen Standard- und Tumor-Zelllinien (bspw. HeLa (van Delft *et al.* 2006), MEFs (van Delft *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007), Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML) (Konopleva *et al.* 2006), SCLC (Oltersdorf *et al.* 2005; Lin *et al.* 2007; Tahir *et al.* 2007) oder das multiple Myelom (MM) (Kline *et al.* 2007)) sowie in entnommenen Patientenproben (CLL (Oltersdorf *et al.* 2005; Vogler *et al.* 2008) oder renales Karzinom (Zantl *et al.* 2007)) getestet. Manche von den Zelllinien wurden zusätzlich in den Xenotransplantat-Mausmodellen auf die Wirksamkeit von ABT-737 getestet (bspw. (Oltersdorf *et al.* 2005; Konopleva *et al.* 2006)). Für die *in vivo* Experimente wurde den Mäusen das ABT-737 meist intraperitoneal verabreicht. ABT-737 kann aufgrund seiner molekularen Eigenschaften die Voraussetzungen für die oralen Arzneimittel nicht erfüllen (Veber *et al.* 2002). Deshalb wurde eine andere, auf der ABT-737 Basis entwickelt und leicht modifizierte Substanz (ABT-263) vorgestellt, die ähnliche apoptotische Merkmale wie der Vorgänger aufweist und zusätzlich oral verfügbar ist (Tse *et al.* 2008). Klinische Studien mit dieser Substanzklasse laufen.

#### **1.1.4 IAPs und das Smac-Mimetikum LBW242**

Die Inhibitoren der Apoptose Proteine oder kürzer genannt IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) wurden Anfang der neunziger Jahre in einem Baculovirus entdeckt (Crook *et al.* 1993). Schon bei der Entdeckung des ersten IAPs wurde festgestellt, dass dieser die apoptotischen Vorgänge in der (Insekten-) Zelle inhibieren kann (Crook *et al.* 1993). Es folgten zahlreiche Studien, welche die Anwesenheit von anderen Mitgliedern der IAP-Familie (d.h. Proteine mit typischen Domänen) in verschiedenen Spezies, von Bäckerhefen bis Menschen, zeigten (Hay *et al.* 1995; Roy *et al.* 1995; Fraser *et al.* 1999; Uren *et al.* 1999). Die humane IAP-Familie besteht aus mindestens acht Mitgliedern: NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, BRUCE, MLIAP und ILP2 (Rothe *et al.* 1995; Roy *et al.* 1995; Duckett *et al.* 1996; Liston *et al.* 1996; Uren *et al.* 1996; Ambrosini *et al.* 1997; Hauser *et al.* 1998; Vucic *et al.* 2000; Richter *et al.* 2001). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen mindestens eine



evolutionär konservierte BIR (*baculovirus IAP repeat*)-Domäne (Birnbaum *et al.* 1994). (Die schematische Struktur von ausgewählten IAPs, nämlich XIAP (IAP gekoppelt mit dem X-Chromosom; *X-chromosome-linked IAP*) sowie cIAPs (cIAP1 und cIAP2, wo „c“ für *cellular/zellulär* steht) ist in der Abbildung 5 dargestellt.) Diese Domäne ist ein Zink-Finger-ähnliches Motiv mit einem zentralen Zink-Ion, das durch drei Cystein- und einen Histidin-Rest koordiniert wird (Hinds *et al.* 1999). Die BIR-Domänen sind für die Protein-Protein Interaktionen der IAPs zuständig und außerdem für ihre anti-apoptotischen Eigenschaften (soweit gegeben) erforderlich (Duckett *et al.* 1998). Die BIR-Domänen 2 und 3 interagieren hauptsächlich mit Molekülen, die eine sogenannte IBM(*interacting BIR motif*)-Sequenz besitzen. Dazu zählen bspw. der mitochondriale IAP-Antagonist Smac/DIABLO oder die Protease OMI/HtrA2. Die BIR1-Domänen der erwähnten IAPs interagieren weder mit Caspasen noch mit anderen IBM-tragenden Proteinen. Beispielsweise bindet BIR1-Domäne von XIAP an TAB1 (die Aktivator-Untereinheit der Kinase TAK1; *TAK1 associating subunit 1*) (Lu *et al.* 2007) und die BIR1-Domänen von cIAP1 und cIAP2 an die Adaptorproteine des TNF-Rezeptor-Komplexes TRAF1 und TRAF2 (*tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors*) (Rothe *et al.* 1995).



**Abbildung 5: Schematische Struktur der humanen XIAP und cIAPs.**

Abkürzungen: BIR = BIR(*baculovirus IAP repeat*)-Domäne; UBA = Ubiquitin-Bindungsdomäne; CARD = Caspase-Rekrutierungsdomäne; RING = RING-Domäne mit der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität; N = N-Terminus; C = C-Terminus. Abbildung nach (Gyrd-Hansen und Meier 2010).

Nach der Entdeckung der anti-apoptotischen Fähigkeiten der IAPs im Jahr 1993 wurde von verschiedenen Gruppen auf Basis experimenteller Daten postuliert, dass IAPs Caspasen inhibieren können. Tatsächlich können die humanen IAPs, nämlich XIAP und cIAPs die Caspasen 3, 7, und XIAP noch zusätzlich die 9, mit ihren BIRs binden (Roy *et al.* 1997; Sun *et al.* 1999; Riedl *et al.* 2001). Allerdings hat sich herausgestellt, dass die Caspasen 3 und 7 durch die cIAP-Bindung nicht inhibiert werden (Eckelman und Salvesen 2006). Somit ist nur XIAP der einzige humane Caspasen-Inhibitor, wobei die physiologische Relevanz einer solchen Inhibition nicht gezeigt ist. Die Sequenz, die sich N-terminal vor seiner BIR2-Domäne befindet, bindet in das aktive Zentrum der Effektor-Caspasen 3 und 7 und bewirkt somit die sterische Hinderung für die Substratbindung dieser Proteasen (Chai *et al.* 2001; Huang *et al.* 2001; Riedl *et al.* 2001). In Insektenzellen scheinen IAPs Apoptose durch Ubiquitinierung und Spiegelkontrolle der Initiatorcaspase DRONC zu regulieren (Tenev *et al.* 2002; Wilson *et al.* 2002). Die BIR2 und BIR3-Domänen sind auch an der Bindung mit der IBM-Sequenz des apoptogenen Moleküls Smac/DIABLO, welcher während der intrinsischen

Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt wird, beteiligt (Liu *et al.* 2000; Wu *et al.* 2000; Chai *et al.* 2001).

Abgesehen von den drei BIR-Motiven besitzen die in der Abbildung 5 dargestellten IAPs eine Ubiquitin-Bindungsdomäne (UBA), welche die Polyubiquitinketten binden kann (Gyrd-Hansen *et al.* 2008). Außerdem haben zelluläre IAPs eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), deren Funktion erst vor kurzem aufgeklärt wurde. Die Forschungsgruppe um Pascal Meier zeigte, dass CARD die Dimerisierung der RING-Domäne bei cIAP1 verhindert (Lopez *et al.* 2011). Nachdem diese für die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität der IAPs verantwortlich ist (Silke *et al.* 2005), konnte bestätigt werden, dass CARD die E3-Aktivität von cIAP1 inhibiert (Lopez *et al.* 2011). Es gibt zahlreiche Studien, die von der Autoubiquitinierung der IAPs sowie von der Ubiquitinierung ihrer verschiedenen Substraten mit Hilfe der RING-Domäne berichten (diskutiert u. a. in (Vaux und Silke 2005; Mace *et al.* 2010)). Deshalb ist auch die anti-apoptotische Funktion der IAPs nicht ihre einzige. Die Proteine aus der IAP-Familie, vor allem cIAP1 und cIAP2 funktionieren als Modulatoren verschiedener Signaltransduktionswege. Die Kinase des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweges NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) wird beispielsweise stets durch cIAP1/2 K48-ubiquitiniert und dadurch für den proteasomalen Abbau markiert, was das Abschalten dieses Signalweges verursacht (Vallabhapurapu *et al.* 2008; Zarnegar *et al.* 2008). Die Kinase des TNFR1-Komplexes RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) wird dagegen durch die cIAPs K63-ubiquitiniert und dadurch mit der Kinase TAK1 (*TGF $\beta$ -activated kinase 1*) assoziiert. In der Abwesenheit von cIAPs, interagiert die nicht-ubiquitinierte RIP1 Kinase mit Caspase-8, was Apoptose modulieren kann (Park *et al.* 2004; Bertrand *et al.* 2008). Es wurde zusätzlich berichtet, dass XIAP sowie cIAP2 die Ubiquitinierungsziele von cIAP1 sind (Conze *et al.* 2005; Cheung *et al.* 2008).

Nichtsdestotrotz besteht eine Verbindung zwischen der Inhibition der Apoptose durch die IAPs und der Tumorentwicklung (diskutiert bspw. in (LaCasse *et al.* 2008)). Oft wurden erhöhte Spiegel von IAPs in verschiedenen humanen Tumorzelllinien sowie Tumorklientenproben gefunden und mit einer schlechten therapeutischen Prognose assoziiert (Tamm *et al.* 2000; Yang *et al.* 2003). Darüber hinaus verursacht die Herunterregulation von IAPs die Induktion von Apoptose sowie Sensibilisierung der Tumorzellen für Chemotherapeutika in manchen Situationen. Somit sind für die tumortherapeutischen Ansätze die Stoffe, welche die endogenen IAP-Antagonisten (wie z. B. Smac) nachahmen, von Interesse. Es wurden bisher viele kleine Moleküle, die auf der Sequenzbasis des IBM-Tetrapeptids von Smac (AVPI) entwickelt wurden, vorgestellt (diskutiert u. a. in (Vucic und Fairbrother 2007)). Eines dieser sogenannten Smac-Mimetika ist LBW242 (Novartis), das mit Hilfe einer SAR (structure-activity relationship)-Studie entwickelt wurde. Es wurde dabei eine minimale Sequenz determiniert, welche für die

Besetzung der BIR3-Bindungstasche von XIAP benötigt wird (Sharma et al. 2006). Es folgten FRET(*fluorescence resonance energy transfer*)-basierte Wettbewerbsassays mit dem biotinylierten Smac-Septamer, welche die funktionelle Spezifität des LBW242 bewiesen haben (Chauhan et al. 2007). LBW242 bindet nicht nur XIAPs BIR3-Domäne (Sharma et al. 2006), sondern auch die BIR3-Domäne von cIAP1 und reguliert zusätzlich noch seine Proteinspiegel herunter (Gaither et al. 2007; Ziegler et al. 2008). Dieser Effekt wurde nicht nur bei den Studien mit LBW242 (Gaither et al. 2007), sondern auch mit anderen Smac-Mimetika beobachtet (Petersen et al. 2007; Varfolomeev et al. 2007; Vince et al. 2007; Bertrand et al. 2008; Wang et al. 2008). In diesen Fällen erfolgt die Apoptoseinduktion nicht über die Neutralisation von XIAP sondern hauptsächlich über den Abbau von den zellulären IAPs. Das Entscheidende ist, dass es sowohl zur Elimination der cIAPs aus dem TNFR-Proteinkomplex kommt, als auch zur Stabilisierung von NIK, was die Aktivierung des kanonischen sowie des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweges verursacht. Das hierdurch in manchen Zellen induzierte TNF $\alpha$  stimuliert die TNF-Rezeptoren auf dem auto- sowie parakrinen Weg und führt somit zur Caspase-8-abhängigen Apoptose.

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente haben die pro-apoptotischen Fähigkeiten des Smac-Mimetikums LBW242 bestätigt. LBW242 hat in verschiedenen Tumor-Zelllinien wie dem multiplen Myelom (MM), der akuten myeloischen Leukämie (AML) oder dem Glioblastom Multiform (GBM) Apoptose ausgelöst (Chauhan et al. 2007; Weisberg et al. 2007; Ziegler et al. 2008). Das Smac-Mimetikum wurde teilweise als Einzeltherapeutikum aber auch in Kombination mit anderen anti-neoplastischen Substanzen wie dem FLT3-Inhibitor PKC412, dem MM-Chemotherapeutikum Melphalan oder dem Tyrosin-Kinasen-Inhibitor Imatinib effektiv eingesetzt (Chauhan et al. 2007; Weisberg et al. 2007; Ziegler et al. 2008). Ähnlich positive Ergebnisse wurden mit LBW242 auch für die Tumor-Patientenproben und die Xenotransplantat-Mausmodelle erreicht (Chauhan et al. 2007; Weisberg et al. 2007; Ziegler et al. 2008).

### **1.1.5 Signaltransduktionswege, die Apoptose steuern können**

Die im Kapitel 1.1.2 beschriebenen Signaltransduktionswege der Apoptose und deren essentiellen Proteine interagieren intensiv mit Molekülen aus anderen Signalwegen in der Zelle. Es besteht also eine konstante „Konversation“, sozusagen ein Wechselspiel der Proteine, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind. In diesem Teil der Arbeit werden die Signaltransduktionswege beschrieben, die sich mit den apoptotischen überschneiden und für das Verständnis des Kapitels „Ergebnisse“ relevant sind.

### 1.1.5.1 Der Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktionsweg und Poly I:C

Die Toll-like Rezeptoren (TLRs; (Rock *et al.* 1998)) gehören zu den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren oder PRRs (*pattern recognition receptors*) und sind ein essentieller Teil des angeborenen Immunsystems von *Drosophila* und Vertebraten (Medzhitov 2001). Diese Typl-Transmembranrezeptoren besitzen eine Fähigkeit, sog. pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs; *Pathogen Associated Molecular Patterns*), also Molekülsequenzen, die sich auf den Pathogenen befinden oder von denen stammen und als „fremd“ bezeichnet werden können, zu erkennen (Janeway 1989).

Es gibt derzeit zehn humane TLRs, welche die pathogen-stammenden Moleküle identifizieren und binden können (Medzhitov 2001). Beispielsweise wird die mikrobielle DNA durch TLR9, einzelsträngige RNA (ssRNA) durch TLR7 und TLR8, doppelsträngige RNA (dsRNA) durch TLR3 und Flagellin durch TLR5 erkannt (Gay und Gangloff 2007). TLR4 war der erste Toll-like Rezeptor, welcher in den Säugetieren entdeckt wurde (Gay und Keith 1991; Medzhitov *et al.* 1997). Dieser Lipopolysaccharid(LPS)-bindende Rezeptor war für die erfolgreiche Bekämpfung einer Infektion, die durch die Gram-negativen Bakterien in den Mäusen hervorgerufen war, notwendig (Poltorak *et al.* 1998). Der Name kam von dem *Drosophila*-Protein Toll, der dem TLR4 ortholog ist (Anderson und Nusslein-Volhard 1984; Anderson *et al.* 1985).

Die Toll-like Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären, einer intrazellulären und einer Transmembrandomäne (Gay und Gangloff 2007). Die extrazelluläre Domäne beinhaltet zahlreiche Leucin-reiche Wiederholungen (LRR, *leucin-rich repeats*) und ist für die Ligandenbindung zuständig (Kobe und Deisenhofer 1995; Gay und Gangloff 2007). Der Hauptbestandteil des intrazellulären Bereiches ist die TIR(*Toll/interleukin-1 receptor (IL1-R) homology domain*)-Domäne, die für die Weiterleitung des Signals verantwortlich ist (Xu *et al.* 2000; O'Neill und Bowie 2007). Dies geschieht durch die Ligand-vermittelte Dimerisierung des Rezeptors und darauf folgende Rekrutierung des Adaptormoleküls (Ozinsky *et al.* 2000; O'Neill und Bowie 2007). Fünf Adaptorproteine wurden bis jetzt identifiziert: MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein*), TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*) und TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) sowie SARM (*sterile alpha and HEAT/Armadillo motif protein*), dessen Funktion noch umstritten ist. Die Aktivierung von TLRs initialisiert die Expression verschiedener Gene, welche für die Entstehung der angeborenen Immunantwort verantwortlich sind (Medzhitov 2001).

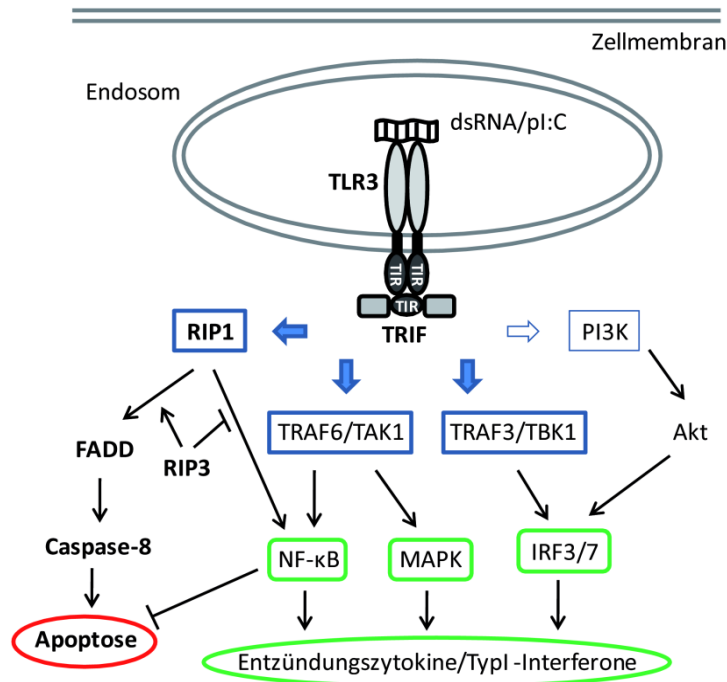
Es wurde beobachtet, dass TLR2 nicht nur die Immunantwort vermitteln, sondern unter Umständen auch Apoptose auslösen kann (Aliprantis *et al.* 1999; Aliprantis *et al.* 2000; Into *et al.* 2002; Lopez *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2003). Die Aktivierung des pro-apoptotischen Signalweges wurde auch nach der TLR4-Stimulation festgestellt (Wang *et al.* 2002; Haase *et*

*al.* 2003; De Trez *et al.* 2005; Kaiser und Offermann 2005). Im Vergleich zum TLR2, der das MyD88 als Adaptorprotein verwendet, kann TLR4 beide Adaptormoleküle MyD88 sowie TRIF rekrutieren (O'Neill und Bowie 2007). Es hat sich herausgestellt, dass TRIF für die Auslösung des apoptotischen Signalweges in der Zelle verantwortlich ist (Han *et al.* 2004; Ruckdeschel *et al.* 2004; De Trez *et al.* 2005; Kaiser und Offermann 2005); wie TLR2, der TRIF nicht benutzt, Apoptose auslöst, ist nicht klar.

Die Aktivierung des TLR3 durch die dsRNA (Alexopoulou *et al.* 2001) kann unter Umständen ebenfalls zum apoptotischen Zelltod führen (beobachtet bspw. in (Ruckdeschel *et al.* 2004; Rasschaert *et al.* 2005; Salaun *et al.* 2006; Sun *et al.* 2011); s. Abbildung 6, links). Dies geschieht, weil der Rezeptor auch über das Adaptorprotein TRIF signalisiert (Yamamoto *et al.* 2002; Hoebe *et al.* 2003; Oshiumi *et al.* 2003; Yamamoto *et al.* 2003). Die Interaktionen zwischen dem dimerisierten TLR3 und TRIF verläuft über die TIR-Domänen der beiden Proteine (O'Neill und Bowie 2007). Es ist bekannt, dass der TLR-induzierte Apoptoseweg u. a. über die FADD-Caspase-8-Achse aktiviert werden kann (Ruckdeschel *et al.* 2002; Haase *et al.* 2003; Ruckdeschel *et al.* 2004; Kaiser und Offermann 2005). Wie allerdings in diesem Fall FADD von TRIF aktiviert wird, ist nicht ganz aufgeklärt. Nachdem TRIF keine Todesdomäne (DD; *death domain*) besitzt, ist die direkte Aktivierung von FADD eher unwahrscheinlich. Die Kinase RIP1 wurde als eine der Kandidaten für die FADD-Aktivierung vorgeschlagen (Han *et al.* 2004; Ruckdeschel *et al.* 2004; Kaiser und Offermann 2005), vor allem weil sie eine DD besitzt (Grimm *et al.* 1996). RIP3 beeinflusst möglicherweise RIP1 so, dass die Induktion der apoptotischen Achse begünstigt wird und es gleichzeitig zur negativen Regulation des Überlebensweges kommt (Meylan *et al.* 2004; Kaiser und Offermann 2005). Es wurde außerdem gezeigt, dass das TNFR1-Adaptorprotein TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*) (Hsu *et al.* 1995) an dem TLR3-Signalweg beteiligt ist (Chen *et al.* 2008; Ermolaeva *et al.* 2008).

TLR3 hat neben seiner pro-apoptotischen Fähigkeit Funktion bei der angeborenen Immunantwort (genau wie die restlichen TLRs) (s. Abbildung 6). Der Rezeptor befindet sich auf den Membranen der intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen (Matsumoto *et al.* 2003; Nishiya und DeFranco 2004; Nishiya *et al.* 2005) und kann dort, wie bereits erwähnt, virale dsRNA erkennen. Nach der Ligand-vermittelten Dimerisierung des Rezeptors (Bell *et al.* 2006) und der Rekrutierung von TRIF kommt es zur Initialisierung von zwei Signalwegen (abgesehen von dem bereits erwähnten apoptotischen Signalweg). Auf der einen Seite werden der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen durch TRAF6 und TAK1 aktiviert (Jiang *et al.* 2003; Sato *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2004; Pisegna *et al.* 2004) (s. Abbildung 6, Mitte). Auch die Kinase RIP1 kann sich an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligen (Meylan *et al.* 2004). Auf der anderen Seite erfolgt die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3/7 (*IFN regulatory factor 3/7*) via TRAF3 und die Kinase TBK1 (*TANK Binding Kinase 1*)

(Sato *et al.* 2003; Hacker *et al.* 2006) gefolgt von der zusätzlichen Phosphorylierung durch PI3K-Akt-Achse (Sarkar *et al.* 2004) (s. Abbildung 6, rechts). Diese Stimulation der Transkriptionsfaktoren führt zu deren Translokation in den Nukleus und zur Expression der Targetgene, wie Entzündungszytokine und Typ I-Interferone, die für die TLR3-assoziierte Immunantwort verantwortlich sind.



**Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Signaltransduktionsweges via TLR3.**

Die aufgenommene und sich in den Endosomen befindende virale dsRNA bzw. ihr synthetisches Analogon Poly I:C wird durch TLR3 erkannt. Nach Ligandenbindung und Dimerisierung des Rezeptors kommt es zur Rekrutierung des Adaptorproteins TRIF. Dies führt zur Bildung von Proteinkomplexen, die im Normalfall schließlich die Expression von Entzündungszytokinen und Typ I-Interferonen induzieren. Die Aktivierung von TLR3 kann unter Umständen zur Apoptose führen. Dabei wird Caspase-8 über das Adaptorprotein FADD aktiviert, die folglich die Caspasenkaskade initiiert. Modifiziert nach (Schroder und Bowie 2005; Borden *et al.* 2007; O'Neill und Bowie 2007)

Für die Tumorforschung ist allerdings die pro-apoptotische Funktion des TLR3 von Interesse, vor allem weil viele Tumorzellen den Rezeptor exprimieren (Huang *et al.* 2005; Salaun *et al.* 2006; Salaun *et al.* 2007; Salaun *et al.* 2011). Für experimentelle Zwecke wird ein synthetischer TLR3-Ligand nämlich polyinosinische:polycytidyliche Säure (Poly I:C) verwendet. Sie ist ein strukturelles Analogon von dsRNA und wurde vor über 40 Jahren für die Interferon-Induktion entwickelt (Field *et al.* 1967). Heutzutage wird Poly I:C als TLR3-Agonist benutzt, um die TLR3-induzierte Signalwege zu untersuchen. Es wurde oft berichtet (bspw. in (Ruckdeschel *et al.* 2004; Jiang *et al.* 2008; Sun *et al.* 2011)), dass das Polymer (teilweise alleine aber auch in Verbindung mit anderen Stimuli) TLR3-abhängige Apoptose

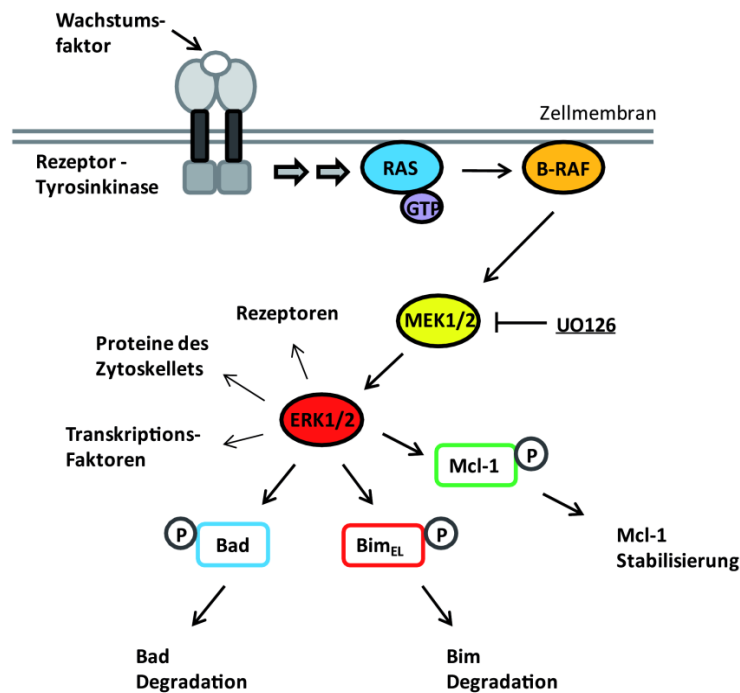
induzieren kann. Deshalb wird Poly I:C als eine viel versprechendes Adjuvanz, z. B. bei Tumorstoffen bzw. ein Hilfsmittel für die Tumorbekämpfung gesehen (Salaun *et al.* 2007).

#### 1.1.5.2 Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg und der MEK-Inhibitor UO126

Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg hat Einfluss auf verschiedene wichtige zelluläre Ereignisse wie Zellproliferation, Apoptose, Zellzyklusregulation und Zellmigration (Wellbrock *et al.* 2004). Diese in der Abbildung 7 schematisch dargestellte Signalkaskade der MAP(*mitogen-activated protein kinase*)-Kinasen hat ihren Ursprung an der Zelloberfläche, wo verschiedene Mitogene (z. B. der epidermale Wachstumsfaktor EGF, *epidermal growth factor*) an ihre Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK; *receptor tyrosine kinases*) binden. Die RTKs dimerisieren und autophosphorylieren und können in Folge mit Hilfe von verschiedenen Adaptorproteinen u. a. das kleine GTP-bindende Protein RAS (abgekürzt von Ratten-Sarkom/*Rat Sarcoma*) aktivieren (Lemmon und Schlessinger 2010). Durch den Austausch von GDP zu GTP kommt es zur Konformationsänderung und darauf folgenden Aktivierung von RAS (Chong *et al.* 2003; McCubrey *et al.* 2007). RAS-GTP kann die Serin/Threonin (S/T) Kinase RAF (kommt von den „rasch wachsenden Fibrosarkomen“ also „*rapidly growing fibrosarcomas*“ verursacht durch das virale Raf) zu der Zellmembran rekrutieren und phosphorylieren (Geyer und Wittinghofer 1997). Die RAF-Kinasen können unterschiedlich stark von vier humanen RAS-Isoformen gebunden werden: NRAS, HRAS, KRAS A und KRAS B (Weber *et al.* 2000). Das aktivierte RAF phosphoryliert die Doppelspezifitäts-Kinasen MEK(*MAP ERK kinase*)1 und MEK2, welche nicht nur die Serin- und Threonin- aber auch die Tyrosinreste phosphorylieren können. Alle RAF Proteine, also BRAF, CRAF (auch RAF1 genannt) und ARAF können die MEK Kinase aktivieren (Wellbrock *et al.* 2004). Von den drei Proteinen phosphoryliert BRAF die MEK aber am potentesten (Alessi *et al.* 1994). Die einzigen bekannten Targets von MEK1/2 sind die Kinasen ERK(*extracellular signal-regulated kinase*)1 und ERK2. Es wurden dagegen bisher über 160 ERK1/2-Substrate identifiziert (McCubrey *et al.* 2007). Zu den ERK-Targets gehören u. a. Transkriptionsfaktoren, Proteine der anderen Signalwege und Rezeptoren (Roux und Blenis 2004).

Die Proteine der Bcl-2-Familie können ebenfalls von ERK reguliert werden. Wie bereits im Kapitel 1.1.3.3 erwähnt, wurde in der Mitte der 90er Jahre gezeigt, dass ERK das BH3-only Protein Bad phosphorylieren kann, was dessen Inaktivierung und Bindung an die 14-3-3-Proteine verursachte (Zha *et al.* 1996). Auch auf die direkte und indirekte negative Regulation von Bim<sub>EL</sub> durch ERK wurde im Kapitel 1.1.3.3 hingewiesen. Auf der einen Seite verursacht die durch ERK durchgeführte Bim<sub>EL</sub>-Phosphorylierung an der Serin 69 dessen Ubiquitinierung und die proteasomale Degradation (Ley *et al.* 2003; Luciano *et al.* 2003; Ley

*et al.* 2004). Bim<sub>EL</sub> wird auch an mindestens zwei anderen Stellen, den Serin-Resten 59 und 104 (bzw. 55 und 100 in der Maus), durch ERK phosphoryliert (Harada *et al.* 2004; Hacker *et al.* 2006). Auf der anderen Seite kann ERK den FOXO3A-Transkriptionsfaktor negativ beeinflussen und somit die Bim-Transkription unterdrücken (Yang *et al.* 2008). Es wurde außerdem berichtet, dass die Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges die durch Anoikis erhöhten mRNA-Spiegels von Bmf reduziert (Schmelzle *et al.* 2007). Zusätzlich wurde beobachtet, dass das anti-apoptotische Bcl-2-artige Protein Mcl-1 von ERK an der Threonin 163 phosphoryliert und dadurch stabilisiert wird (Domina *et al.* 2004). Andere berichteten dagegen von einer eher schwachen ERK-abhängigen Mcl-1-Phosphorylierung; dafür wurden zwei Aminosäureresten (Serin 121 und Threonin 163) identifiziert, die durch den JNK-Signalweg phosphoryliert wurden (Inoshita *et al.* 2002). Die Phosphorylierung von Mcl-1 an Serin 159 durch die Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3) wurde dagegen als destabilisierend und somit pro-apoptotisch wirkend eingeordnet (s. Kapitel 1.1.5.3 und (Maurer *et al.* 2006)).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des MAPK-Signaltransduktionsweges.**

Die Bindung eines Mitogens an die Rezeptor-Tyrosinkinase führt zu dessen Dimerisierung und Autophosphorylierung. Danach wird mit Hilfe von verschiedenen Adaptorproteinen die Kinase RAS aktiviert, welche in der Folge die BRAF-Kinase phosphoryliert. Infolgedessen phosphoryliert BRAF die Kinase MEK1/2, welche dann ERK1/2 aktiviert. ERK1/2 besitzt viele zelluläre Targets u. a. verschiedene Transkriptionsfaktoren sowie die Proteine aus der Bcl-2-Familie. ERK1/2 kann Bad und Bim phosphorylieren, was zu deren Inaktivierung bzw. Degradation führt. Die Phosphorylierung von Mcl-1 bedeutet dagegen die Stabilisierung des anti-apoptotischen Proteins. Modifiziert nach (Wellbrock *et al.* 2004; Grant 2008)



Nachdem der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg das Überleben der Zelle antreibt, ist es keine Überraschung, dass er in der Kanzerogenese eine große Rolle spielt. Diese Signalkaskade ist in ca. 30 % aller humanen Tumoren überaktiviert (Hoshino *et al.* 1999). Lange Zeit galt RAS als das Haupt-Onkogen, welches für diese Hyperaktivität verantwortlich ist. Es stimmt auch, dass die Mutationen im *RAS*-Gen in ca. 15 bis 30 % der Tumorarten vorkommen (Bos 1989). Neuere Studien zeigen zusätzlich, dass die Mutationen in dem *BRAF*-Gen, ebenfalls für die andauernde Aktivierung dieser Signalkaskade die Verantwortung tragen. Ungefähr 7 % aller Tumorarten weisen eine *BRAF*-Mutation auf (Davies *et al.* 2002). Auf den ersten Blick scheint es nicht viel zu sein, es gibt aber Tumorarten, in denen diese Mutation sehr verbreitet ist. Bei dem papillären Schilddrüsenkrebs kommt die Mutation bis 53 %, beim kolorektalen Adenocarcinom bis 22 %, beim ovarialen Tumor ca. 30 %, beim Bauchspeicheldrüsenkrebs ebenfalls ca. 30 % und beim malignen Melanom bis sogar 70 % der Fälle vor (Fraser *et al.* 1999; Davies *et al.* 2002; Tuveson *et al.* 2003; Garnett und Marais 2004).

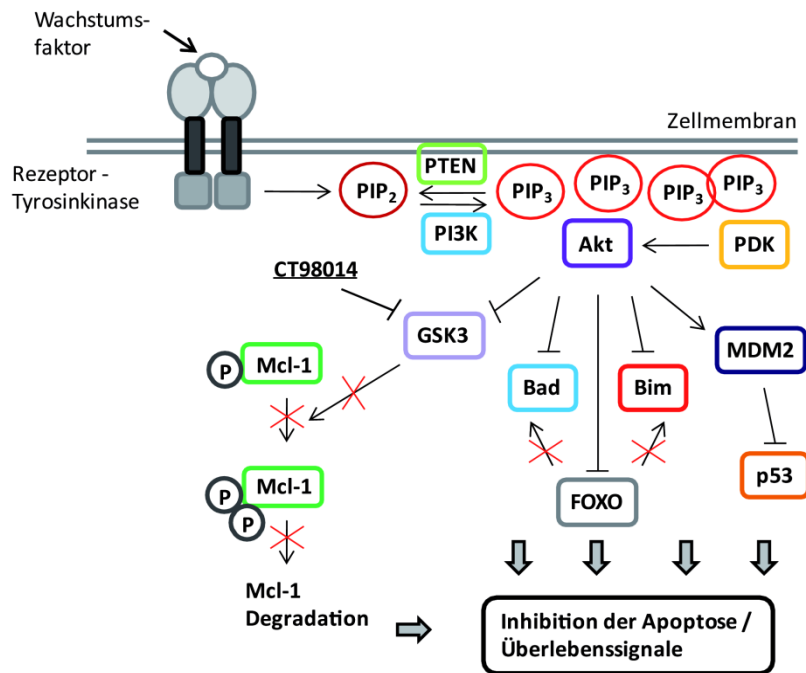
Deshalb ist der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg ein Target für die Tumorthherapie, besonders für die Krebsarten, in welchen die Signalkaskade hyperaktiv ist. Der erste beschriebene spezifische Inhibitor von MEK war PD98059 (Dudley *et al.* 1995). Es folgte UO126, der mit PD98059 strukturell nicht verwandt ist, aber genauso wie der erste Inhibitor die Kinasen MEK1 und -2 (und in gewissem Ausmaß MEK5) nicht-kompetitiv inhibieren kann (Favata *et al.* 1998). Beide Inhibitoren, die für die spezifische Hemmung des MEK/ERK-Signalweges gerne in Zellkultur verwendet werden, zeigen anti-proliferative Effekte hauptsächlich *in vitro* (Alessi *et al.* 1995; Favata *et al.* 1998). Allerdings ist ihre klinische Anwendung aufgrund der schlechten pharmakologischen Eigenschaften nicht weiter vorangetrieben worden (Friday und Adjei 2008).

### 1.1.5.3 Der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg

Der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg ist ein weiterer Signalling-Zweig, der sich *downstream* u. a. von den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) befindet (Engelman *et al.* 2006). Eine vereinfachte Darstellung dieses Signalweges ist in der Abbildung 8 aufgezeigt. Die Erzeugung des Signals erfolgt an der Zelloberfläche, indem Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren binden. Dies verursacht (teilweise mit Hilfe verschiedener Adaptorproteinen) die Membran-Rekrutierung und die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) (Katso *et al.* 2001). Im Fall der Ligandenbindung an die RTKs wird die Klasse IA der PI3Ks aktiviert. Die Mitglieder dieser Klasse sind Heterodimere, welche aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit aufgebaut sind. Durch Bindung der SH2(Src-Homologie 2)-Domäne der p85-Untereinheit an den Rezeptor bzw. Adaptor erfolgt die Membran-Rekrutierung der PI3Ks (Engelman *et al.* 2006). Die kleine GTP-ase RAS (s. Kapitel 1.1.5.2) kann PI3K ebenfalls aktivieren (Jun *et al.* 1999), was durch seine Bindung an

die p110-Untereinheit geschieht. Nachdem sich die Lipidkinasen an der Plasmamembran befinden, phosphorylieren sie Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphaten (PIP<sub>3</sub>) (Sasaki *et al.* 2009). Die Akkumulation von PIP<sub>3</sub> verursacht die Membran-Rekrutierung und Aktivierung weiterer Proteine des PI3K/Akt-Signalweges (Di Paolo und De Camilli 2006), bspw. einer Kinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), welche die Effektor kinase Akt (auch Proteinkinase B/PKB genannt) phosphoryliert (Franke *et al.* 1997; Klippel *et al.* 1997; Mora *et al.* 2004). Zusätzliche Akt-Phosphorylierung durch mTOR(*mammalian target of rapamycin*)-rictor(*rapamycin insensitive companion of mTOR*)-Komplex ist für die endgültige Aktivierung der Kinase nötig (Sarbasov *et al.* 2005). Glykogen Synthase Kinase 3α (GSK3α), GSK3β, MDM2, FOXO-Transkriptionsfaktoren sowie die BH3-only Proteine Bim und Bad sind nur ein paar Beispiele der Akt-Targets (Engelman *et al.* 2006; Engelman 2009). Die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> kann wiederum durch eine Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) erfolgen und zur Hemmung der Signalkaskade führen. Diese Entdeckung hat somit PTEN als einen wichtigen Tumorsuppressor klassifiziert (Li *et al.* 1997; Steck *et al.* 1997; Maehama und Dixon 1998).

Der durch PI3K-initiierte Signalweg ist für das Überleben, die Proliferation, die Motilität, die Glukose-Homöostase und das Wachstum der Zelle von Bedeutung (Engelman *et al.* 2006). Die fehlerhafte Aktivierung dieser Signalkaskade kann somit u. a. zur Tumorentstehung und Tumorentwicklung führen (Liu *et al.* 2009; Bunney und Katan 2010). Die Entdeckung der negativen Regulation des PI3K/Akt-Signalweges durch PTEN (siehe oben) war gleichzeitig eine Entdeckung der Verbindung dieser Signalkaskade mit der Tumorentstehung. Im gleichen Jahr wurde der direkte Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt-Signalweg und der Apoptose entdeckt. Es wurde in zwei unabhängigen Studien beobachtet, dass die Phosphorylierung von Bad und somit seine Inaktivierung durch die Kinase Akt gesteuert werden kann (Datta *et al.* 1997; del Peso *et al.* 1997). Danach wurde auch über die indirekte Inhibition von Bim durch Akt berichtet, welche über die Hemmung des FOXO-Transkriptionsfaktors erfolgt (Stahl *et al.* 2002). Ein Vorschlag der direkten Inaktivierung von Bim durch Phosphorylierung an Serin 87 wurde ebenfalls gemacht (Qi *et al.* 2006). Außerdem belegen verschiedene Studien, dass Akt die anti-apoptotischen Proteine wie Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 und A1 hochregulieren und dadurch Apoptose inhibieren kann (Jones *et al.* 2000; Pugazhenti *et al.* 2000; Song *et al.* 2004). Darüber hinaus kann Akt die Protease-Aktivität von Caspase-9 blockieren, indem es ihre Pro-Form phosphoryliert (Cardone *et al.* 1998). Die Bedeutung dieses Vorgangs ist allerdings nicht klar.



**Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges.**

Die Ligandenbindung an die RTK verursacht deren Dimerisierung und Phosphorylierung. Dabei wird die Lipidkinase PI3K aktiviert, die PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> an der Zellmembran phosphoryliert. Die Akkumulierung von PIP<sub>3</sub> führt zur Rekrutierung von verschiedenen Proteinen an die Plasmamembran und deren Aktivierung. U. a. wird die Kinase PDK aktiviert, welche folglich die Kinase Akt phosphorylieren kann. Akt besitzt viele verschiedene zelluläre Targets und kann u. a. die Proteine des apoptotischen Signalweges regulieren. Bspw. kann Akt den p53-Hemmer MDM2 aktivieren sowie die BH3-only Proteine Bad und Bim direkt und indirekt (über die Inhibition des Transkriptionsfaktors FOXO) negativ beeinflussen. Ein weiteres Target von Akt ist die Kinase GSK3, welche das anti-apoptotische Protein Mcl-1 nach der Initial-Phosphorylierung weiter phosphorylieren kann. Die durch GSK3 verursachte Phosphorylierung von Mcl-1 führt zu dessen Proteasom-abhängigen Degradation. Wenn der PI3K/Akt-Signalweg eingeschaltet ist, kommt es zur Inhibition von GSK3 durch Akt und schließlich zu keiner Mcl-1-Phosphorylierung und folglich zu keinem Abbau des anti-apoptotischen Proteins. Modifiziert nach (Balmanno und Cook 2009; Engelman 2009; Liu *et al.* 2009)

Die Kinase GSK3 (beim Menschen gibt es die zwei Isoformen:  $\alpha$  und  $\beta$ ), deren Aktivität durch Akt gehemmt wird, kann Proteine des apoptotischen Signalweges ebenfalls regulieren. Maurer und Kollegen haben festgestellt, dass GSK3 in den IL-3-abhängigen Zellen nach Wachstumsfaktorentzug die Apoptose auslöst. Dabei wird Mcl-1 durch GSK3 an der Serin 159 phosphoryliert, was zu dessen Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau führt (Maurer *et al.* 2006). Allerdings erfordert die Phosphorylierung durch GSK3 eine Initial-Phosphorylierung des Substrats (Fiol *et al.* 1987). Diese findet bei Mcl-1 an der Threonin 163 statt und wird von der MAP-Kinase ERK durchgeführt (s. Kapitel 1.1.5.2). Die in der gleichen Studie beschriebene Blockierung der GSK3 $\beta$  mit dem Inhibitor CHIR-611 (ursprünglich CHIR 98014 genannt) führt zur Mcl-1-Stabilisierung und zur Inhibition der IL-3-Entzug-initiierten Apoptose (Maurer *et al.* 2006) (s. Abbildung 8).

## **1.2 Das maligne Melanom**

Krebs ist mittlerweile die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern (Jemal *et al.* 2011). Es wurde weltweit für das Jahr 2008 geschätzt, dass die Todesfälle aufgrund von Krebserkrankungen bei 7,6 Millionen und die neuen Tumorfälle bei 12,7 Millionen liegen werden (Jemal *et al.* 2011). Alleine in den USA wurden im Jahr 2010 über 1,5 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert. In der Liste der Neuerkrankungen aller Krebsarten belegt das maligne Melanom, auch als schwarzer Hautkrebs bekannt, in den USA im Jahr 2010 den fünften Rang bei den Männern mit 38.870 Fällen und den siebten bei den Frauen mit 29.260 Fällen. Die Todesfälle aufgrund des malignen Melanoms sind zwischen den Jahren 1990-1991 und dem Jahr 2006 stets gestiegen (Jemal *et al.* 2010). Die Inzidenz des schwarzen Hautkrebses wächst am schnellsten im Vergleich mit anderen Tumorarten (Linos *et al.* 2009). Schätzungsweise liegt diese für das Jahr 2010 bei 5 % für Männer und bei 4 % für Frauen (Jemal *et al.* 2010). Die 5-jährige Überlebensrate für die Patienten mit dem metastasierenden Tumor der Phase IV liegt immer noch unter 10 % (Balch *et al.* 2009).

### **1.2.1 Die Entstehung des malignen Melanoms**

Das humane maligne Melanom entsteht durch die maligne Transformation von Melanozyten. Melanozyten sind Pigment-produzierende Zellen, die sich in der Basalmembran der humanen Epidermis befinden (Uong und Zon 2010). Bei der Entstehung des Melanoms wandern die transformierten Melanozyten von der Basalmembran zuerst in die „höheren“ Bereiche der Epidermis. Die Melanomzellen sind nun zwischen den Epithelzellen verstreut, aber die darunter liegende Basalmembran bleibt intakt (Chudnovsky *et al.* 2005). Diese erste histologische Entwicklungsstufe heißt radiale Wachstumsphase oder RGP (*radial growth phase*), da die Zellen strahlenförmig verstreut sind und in der epidermalen Ebene bleiben. Ein so entstandenes Melanom wird als „In-situ Melanom“ bezeichnet, da es keine invasiven Eigenschaften aufweist. Somit kann ein RGP-Melanom, das früh entdeckt wurde, relativ problemlos chirurgisch entfernt werden (Chudnovsky *et al.* 2005). Die nächste histologische Entwicklungsstufe des Melanoms ist die vertikale Wachstumsphase, auch VGP (*vertical growth phase*) genannt und ist mit dem Durchbruch der Basalmembran verbunden. Das maligne Melanom in der VGP hat die Epidermis in Richtung Dermis verlassen und kann nun metastasieren (Chudnovsky *et al.* 2005). Die letzte Entwicklungsstufe des Melanoms ist das metastasierende Melanom, welches sich im Normalfall in Richtung Lymphknoten und dann Lunge und andere Organe bewegt (Balch *et al.* 2009).

Eine weitere Klassifizierung der Entwicklungsphasen des malignen Melanoms sind die klinischen Stufen, die auf den prognostischen Faktoren der Patienten basieren. Vor zwei Jahren wurde die Stufung für das Melanom durch die *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) erneut überarbeitet (Balch *et al.* 2009). Eine vereinfachte Übersicht der Einteilung

des Melanoms ist in der Tabelle 1 zu sehen (Chudnovsky *et al.* 2005). Die einzelnen Stufen werden außerdem mit den folgenden Faktoren charakterisiert: T: die Tumordicke; N: Anzahl von Lymphknotenmetastasen, M: Metastasen in anderen Organen (Balch *et al.* 2009).

**Tabelle 1: Die vereinfachte Übersicht der klinischen Stufen für das Melanom (Chudnovsky *et al.* 2005).**

Klinische Stufen	Eigenschaften
Stufe 0	Nur Epidermis ist vom Melanom betroffen.
Stufe I und II	Melanom wird durch die Tumordicke und den Entwicklungsstatus gekennzeichnet. Keine Metastasen vorhanden.
Stufe III	Melanom ist durch Lymphknotenmetastasen gekennzeichnet. Keine weiteren Metastasen vorhanden.
Stufe IV	Melanom wird durch Metastasen in verschiedenen Organen und den Gehalt der Lactat Dehydrogenase (LDH) in Serum gekennzeichnet.

Die Untersuchungen von Patientenproben sowie Zelllinien, die aus Patiententumorzellen stammen, haben dazu beigetragen, die molekularen Mechanismen der Melanomentstehung und -entwicklung besser zu verstehen. Unabhängig von der Tumorart müssen die Zellen (auch Melanozyten), aus denen der Tumor entsteht, verschiedene Fähigkeiten besitzen. Am Anfang der Tumorentwicklung sind Eigenschaften wie Selbstgenügsamkeit in der Produktion von Wachstumsfaktoren, die Unempfindlichkeit auf Anti-Wachstum-Signale, die ununterbrochene Angiogenese und das Umgehen der Apoptose erforderlich. Danach spielen ein unbegrenztes Replikationspotential sowie die Fähigkeit zu Gewebeinvasion und zu Metastasierung eine entscheidende Rolle (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011). Diese sechs Fähigkeiten, die für die maligne Entwicklung einer Zelle benötigt werden, können nur dann erworben werden, wenn eine Reihe von Mutationen im Genom stattgefunden hat. Die unerwünschten Veränderungen in der DNA werden normalerweise durch ein komplexes Reparatursystem ausgebessert. Wenn die Reparatur nicht gelingt, wird im Regelfall der Zellzyklus angehalten oder Apoptose der Zelle induziert. In Tumorzellen muss deshalb auch eine genomische Instabilität auftreten, so dass die entstandenen Mutationen nicht entfernt oder verbessert werden (Hanahan und Weinberg 2000). Vor allem die Mutationen in den Signaltransduktionswegen, welche für das Überleben, die Apoptose und die Proliferation bzw. Seneszenz der Zelle verantwortlich sind, sind hier von Bedeutung.

Zwei wichtige Signalwege, welche in vielen Tumoren inklusiv dem Melanom hyperaktiviert sind, sind die bereits in den Kapiteln 1.1.5.2 und 1.1.5.3 beschriebenen MAPK- bzw. PI3K/Akt-Signalwege (Garnett und Marais 2004; Wellbrock *et al.* 2004; Engelman 2009; Kuphal und Bosserhoff 2009). In den meisten Fällen des Melanoms ist die Mutation der Kinase BRAF für die kontinuierliche Aktivierung dieser Signalkaskade verantwortlich. Die Substitution einer einzelnen Aminosäure, nämlich Valin zur Glutaminsäure auf der Position

600 ( $BRAF^{V600E}$ ), ist in ca. 90 % aller Melanome mit  $BRAF$ -Mutation festgestellt worden (Davies *et al.* 2002). Diese Veränderung in der Aminosäuresequenz führt dazu, dass  $BRAF$  dauerhaft aktiv bleibt und seine *downstream* Targets phosphoryliert. Wie oben bereits erwähnt, wird somit die Signalkaskade eingeschaltet, die als ein Ziel das Überleben und das Wachstum der Zelle hat. Interessanterweise wurde die  $BRAF^{V600E}$ -Mutation nicht nur in malignen, sondern auch in benignen Nävi festgestellt (Kumar *et al.* 2004; Saldanha *et al.* 2004). Es bedeutet also, dass diese Mutation nicht ausreicht, um die Melanozyten zu transformieren, es bleibt aber ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Tumorentstehung (diskutiert in (Ko und Fisher 2011)).

Das unbegrenzte Replikationspotential des Melanoms schließt den Kontrollverlust über den Zellzyklus ein. Dabei spielen zwei Signalwege eine Rolle, die über den Übergang von der G1- zur S-Phase wachen. Einer dieser Signalwege wird durch p53, der andere durch RB (Retinoblastom Protein) reguliert. Diese Tumorsuppressorproteine werden durch die Produkte des  $CDKN2A$ (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)-Gens, nämlich die Proteine  $p14^{ARF}$  und  $p16^{INK4a}$  reguliert. Beide Eiweiße entstehen durch das alternative Leseraster des  $CDKN2A$ -Gens (Quelle *et al.* 1995).  $p14^{ARF}$  stabilisiert den „Wächter des Genoms“ p53, indem es dessen Inhibitor MDM(*murine double minute*)2 bindet und somit die MDM2-vermittelte proteasomale Degradation von p53 hemmt (Kamijo *et al.* 1998; Pomerantz *et al.* 1998; Stott *et al.* 1998).  $p16^{INK4a}$  bindet zwei Kinasen, CDK(*cyclin-dependent kinase*)4 und CDK6, und inhibiert dadurch die RB-Phosphorylierung. Somit bleibt RB stets aktiv und verhindert die Progression des Zellzyklus, indem es den Transkriptionsfaktor E2F bindet (Serrano *et al.* 1993). Die Gen-Mutationen oder der Verlust von  $CDKN2A$  haben einen negativen Einfluss auf die RB- und p53-Signalwege und führen zum unkontrollierten G1→S-Phase-Übergang und somit zur Melanomproliferation (Zhang *et al.* 1998; Chin 2003; Chudnovsky *et al.* 2005).

Um nicht in die post-mitotische Phase irreversibel einzutreten, müssen Tumorzellen ihre Enddifferenzierung vermeiden (Hanahan und Weinberg 2000). Der Transkriptionsfaktor MITF (*the microphthalmia-associated transcription factor*) auch „Master-Regulator der Melanozyten“ genannt, ist ein Melanozyten-spezifisches Gen, das u. a. während der Melanozyten-Entwicklung eine bedeutsame Rolle spielt (Fuse *et al.* 1999). MITF ist ein alkalisches hHLH(*helix-loop-helix*)-Leucine-Zipper-Protein, das verschiedene Pigment-produzierende Gene (bspw. *Dct* (*dopachrome tautomerase*) oder *Tyrosinase*) aktiviert (Yasumoto *et al.* 1994; Fuse *et al.* 1999). Nachdem eine hohe MITF-Expression zur Differenzierung der Melanozyten führt, konnte in verschiedenen invasiven Melanomen ein niedriger MITF-Proteinspiegel nachgewiesen werden (Hoek *et al.* 2008). Das wirkt in eine ähnliche Richtung wie der Befund, dass ein erhöhter MITF-Proteinspiegel mit der anti-proliferativen Aktivität der Melanome in Verbindung steht (Wellbrock und Marais 2005). Auf

der anderen Seite wurde von einer *MITF*-abhängigen Regulation von *Bcl-2* berichtet, die das Überleben sowohl der Melanozyten als auch der Melanomzellen möglicherweise vorantreibt (McGill *et al.* 2002).

Die Rolle von UV-Strahlung bei der Entstehung des nichtmelanozytären Hautkrebses (*non-melanoma skin cancer*; auch heller Hautkrebs genannt), also einer Hautkrebsform, die nicht aus Melanozyten entsteht, ist bewiesen (Preston und Stern 1992; Narayanan *et al.* 2010; von Thaler *et al.* 2010). Dagegen ist die Verbindung zwischen der Wirkung des UV-Lichtes auf die Haut und der Melanomgenese immer noch umstritten. Es gibt Melanomtypen, die auf Hautbereichen entstehen, welche der Sonne eher wenig exponiert werden. Das akrolentiginöse Melanom (ALM; *Acral Lentiginous Melanoma*) beispielsweise entsteht auf der Haut der Fußsohlen oder Handflächen, die in der Regel der Sonne selten ausgesetzt werden. Auf der anderen Seite sind hellhäutige Menschen vom Melanom häufiger betroffen als dunkelhäutige Individuen, die mehr UV-absorbierendes Melanin in der Haut besitzen (Jhappan *et al.* 2003; Chudnovsky *et al.* 2005; von Thaler *et al.* 2010). Es scheint, dass die intermittierende Sonnenexposition, vor allem Sonnenbrände während der Kindheit und weniger die kumulative Lichtexposition (die Ausnahme ist das Lentigo-maligna-Melanom) das Melanomrisiko erhöhen (Berking 2005; Berneburg und Surber 2009; von Thaler *et al.* 2010). Die am häufigsten vorkommenden Melanomtypen, das superfiziell-spreitende Melanom (ca. 70 % Häufigkeit) und das noduläre maligne Melanom (10-25 % Häufigkeit), entstehen eben an den Körperstellen, die periodisch und gleichzeitig stark der Sonne ausgesetzt werden (weibliche Beine und männliche Oberkörper) (Berking 2005; Chudnovsky *et al.* 2005).

Es ist auf jeden Fall unumstritten, dass UV-Licht Schäden in der DNA verursacht. Die UV-Strahlung, die an der Erde ankommt besteht in ca. 90 bis 99 % aus UVA (Wellenlänge 315-400 nm) und nur 1 bis 10 % aus UVB (Wellenlänge 280-315 nm) (Jhappan *et al.* 2003; Narayanan *et al.* 2010). Die Mechanismen für die Erbgut-Schädigung durch UVA- und UVB-Strahlen sind verschieden. Während die UVB-Strahlung die DNA direkt angreifen kann, werden durch die UVA-Strahlung sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) gebildet, die dann die DNA schädigen können. Durch die Wirkung des UVB-Lichtes können G→T und CC→TT Transitionen, C→A und G→T Transversionen sowie DNA-Doppelstrangbrüche entstehen. Die UVA-Strahlung führt zur Bildung von ROS (bspw. Superoxidradikal oder Hydroxyradikal), indem zelluläre Chromophore diese Strahlen absorbieren. Als Folge treten Einzel- sowie Doppelstrangbrüche der DNA auf. Zusätzlich kann die Nukleinbase Guanin zu 7,8-Dihydroxy-2'-Oxoguanin (auch 8-OxoG genannt) oxidiert werden, was mit der Entstehung der G→T und T→G Transversionen verbunden ist (Berking 2005; Narayanan *et al.* 2010; von Thaler *et al.* 2010).

Umweltfaktoren wie die bereits beschriebene UV-Strahlung sind für die Entstehung von Melanomen zwar von Bedeutung, sind aber nur eine Seite der Medaille. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass auch genetische Faktoren bei der Melanomgenese eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits angesprochen, ist das Melanomrisiko für die hellhäutigen Menschen höher als für die dunkelhäutigen Personen. Die dunkle Haut wird also seltener vom malignen Melanom betroffen (Armstrong und Krickler 2001; Gloster und Neal 2006), was mit der Verteilung des Pigments Melanin zusammenhängt. Es gibt zwei Typen von Melanin beim Menschen, das dunkle braun-schwarze Eumelanin, dessen höhere Mengen in der Haut der dunkelhäutigen Individuen vorhanden sind, und das hellere rot-gelbe Phäomelanin, das in den skandinavischen Hauttypen überwiegt (Jhappan *et al.* 2003; Berking 2005; von Thaler *et al.* 2010). Im Gegensatz zum Phäomelanin, hat das Eumelanin eine UV-schützende Funktion. Es kann UVB-Strahlung absorbieren und auch durch UVA-Strahlung entstandene ROS auffangen, bevor diese die DNA angreifen (Sarna 1992; Ortonne 2002; Jhappan *et al.* 2003; Hussein 2005; Wood *et al.* 2006; Brenner und Hearing 2008). Die Synthese von Eumelanin in Melanozyten erfolgt nach der Stimulation des Melanocortinrezeptors 1 (MC1R) (Abdel-Malek 2010). Dieser G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptor löst nach Bindung von  $\alpha$ -Melanozyt-stimulierenden Hormon ( $\alpha$ -MSH) eine Signalkaskade aus, die letztendlich zur Eumelanin-Produktion führt (Chhajlani und Wikberg 1992; Gantz *et al.* 1994; Jhappan *et al.* 2003). Manche Varianten des *MC1R*-Gens (hauptsächlich R151C, R160W, und D294H) stehen mit rothaarigem Phänotyp, mit der Hellhäutigkeit und einem erhöhten Risiko für Melanomentstehung in Verbindung (Abdel-Malek 2010).

### 1.2.2 Behandlung des Melanoms

Die einfachste Behandlung eines primären, nicht-metastasierenden Melanoms ist seine chirurgische Entfernung. Das Problem ist die Therapie von Patienten mit dem aggressiven malignen Melanom, vor allem wenn der Tumor bereits Metastasen gebildet hat. Das *American Joint Committee on Cancer* empfiehlt bei Patienten mit metastasierendem Melanom der Stufe IV eine Monochemotherapie mit Dacarbazin (DTIC). Das Ansprechen auf dieses alkylierende Chemotherapeutikum sowie auf dessen orales Analogon Temozolomid liegt bei ungefähr 15 % und ist leider von kurzer Dauer (Garbe *et al.* 2011). Bei Dacarbazin-behandelten Patienten mit Ansprechen betrug die mediane Ansprechdauer 4 bis 6 Monate (Tahini und Agarwala 2006). Nur bei 1-2 % der Patienten wurde ein langfristiges Ansprechen auf die beiden oben genannten Chemotherapeutika festgestellt (Eigentler *et al.* 2003). Die Therapie von Melanom-Patienten mit anderen Chemotherapeutika wie Cisplatin, Nitrosoharnstoffen (bspw. Fotemustin), Vincaalkaloiden (bspw. Vinblastin und Vincristin) sowie Taxanen (bspw. Paclitaxel) ergab ähnlich niedrige Ansprechraten wie bei der Therapie mit Dacarbazin (Buzaid 2002; Ko und Fisher 2011). Die Verwendung einer



Polychemotherapie bspw. aus Dacarbazin, Vinblastin, Cisplatin und Tamoxifen hat keinen Gewinn bzgl. der Überlebensdauer der Patienten im Vergleich zur DTIC-Monotherapie gezeigt (Atkins *et al.* 2008).

Eine andere Therapieoption für Patienten mit metastasiertem Melanom ist eine Immuntherapie mit dem Zytokin Interleukin-2 (IL-2). Dabei wird eine hohe Dosis von rekombinantem IL-2 verabreicht. Die objektive Ansprechrate lag bei ca. 16 % und die komplette Remission wurde bei ca. 5 % der Patienten nachgewiesen (Garbe *et al.* 2011). Die Therapie mit IL-2 ist allerdings mit einer stationären Behandlung verbunden und bringt hohe Kosten mit sich sowie Dosis-limitierende Toxizität für ZNS, Respirationstrakt und Blutkreislaufsystem (Tarhini und Agarwala 2006; Garbe *et al.* 2011).

Die Erfolglosigkeit von Standard-Chemotherapien sowie -Immuntherapien hat dazu geführt, dass eine Kombination aus diesen zwei Behandlungen getestet wurde. Die so genannte Biochemotherapie besteht aus der (Poly-)Chemotherapie mit bspw. Stoffen wie DTIC, Vinblastin, Cisplatin (abgekürzt DVC) und einer darauf folgenden Immuntherapie mit IL-2 und Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Die simultane Verabreichung von Chemo- und Immuntherapie ist ebenfalls getestet worden, zeigte aber auch keine weiteren Vorteile gegenüber einer sequentiellen Behandlung. Beide Möglichkeiten haben in klinischen Studien der Phase II ähnliche Gesamtansprechraten hervorgerufen, die sich zwischen 40 % und 60 % bewegten. Eine langfristige Remission wurde bei ca. 9 % der Patienten festgestellt (Tarhini und Agarwala 2006). Auch wenn die Ansprechraten durch sequentielle Biochemotherapie verbessert worden sind, blieben das progressionsfreie sowie das Gesamt-Überleben in den randomisierten Studien der Phasen II und III gleich einer reinen Chemotherapie (Garbe *et al.* 2011).

Damit ist es klar, dass die bisherigen Standardtherapien nur wenige Erfolge in der Melanombehandlung erzielt haben. Deshalb ist es von Bedeutung, neue, gezielte Therapien gegen das maligne Melanom zu entwickeln. Dabei spielt die Erforschung der molekularen Mechanismen, die für Melanomentstehung, -entwicklung und -invasion verantwortlich sind, eine entscheidende Rolle. Eine genaue Kenntnis von Signalwegen, die für Melanomwachstum und -überleben essentiell sind, könnte neue, gezielte Interventionsmethoden ermöglichen. Die Inhibition von Proteinen, die überaktivierte Signalwege modulieren, ist entsprechend in den letzten Jahren eines der Hauptziele der Pharmaindustrie geworden.

Die Identifizierung von *BRAF* als des meist mutierten Gens im Melanom (Davies *et al.* 2002) führte zur Entwicklung von zahlreichen Inhibitoren des MAPK-Signalweges (s. Kapitel 1.1.5.2 und 1.2.1.). Einer dieser Hemmer ist der Multi-Kinasen-Inhibitor Sorafenib (Nexavar®, BAY-439006), der *BRAF*, *CRAF* und zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen für VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sowie für PDGF (*platelet derived growth factor*) blockiert (Wilhelm

*et al.* 2004). Leider war die Monotherapie des Melanoms mit Sorafenib wenig erfolgreich. Die zusätzliche Behandlung mit Chemotherapeutika wie Carboplatin, Paclitaxel oder Temozolomid zeigte in Phase II der klinischen Studien zwar eine höhere Antitumor-Aktivität (Ko und Fisher 2011), brachte aber im Allgemeinen keine Therapievorteile für die in der Phase III behandelten Patienten (Garbe *et al.* 2011). PLX4032 dagegen ist ein selektiver BRAF<sup>V600E</sup>-Inhibitor, der nur das mutierte BRAF Protein gezielt hemmt. In Phase I-Studien hat die PLX4032-Behandlung eine objektive Ansprechrates von ca. 70 % gezeigt. Der Inhibitor soll demnächst in der Phase III gegen Dacarbazin getestet werden (Garbe *et al.* 2011).

Inhibitoren von Proteinen des apoptotischen Signaltransduktionsweges wurden ebenfalls für die Melanom-Therapie entwickelt und getestet. Oblimersen (Genasense®) ist ein antisense Oligonukleotid, das in zahlreichen Tumorzellen die Bcl-2-Proteinexpression unterdrückt (Kang und Reynolds 2009). Zusätzlich enthält diese Substanz zwei CpG-Motive, welche durch TLR9 erkannt werden und potentiell einen immunostimulatorischen Effekt auslösen können (Jahrsdorfer *et al.* 2002). Oblimersen hat in den klinischen Phasen I und II die Hoffnung auf eine Sensibilisierung des Melanoms für die Behandlung mit Dacarbazin gemacht (Jansen *et al.* 2000). Die randomisierte Studie der Phase III hat allerdings über keine Verbesserung des Gesamt-Überlebens der Patienten mit dem metastasierenden Tumor berichten können (Tarhini und Agarwala 2006). Ein neues pro-apoptisches Agens (mit zusätzlichen anti-angiogenetischen Eigenschaften), Tasisulam (LY573636), induziert apoptotischen Zelltod in verschiedenen Tumorarten inklusive des Melanoms. Dies erfolgt nach ROS-Produktion und wird über die Mitochondrien vermittelt, der genaue Mechanismus ist aber nicht bekannt. Die Untersuchungen von Tasisulam in der klinischen Phase II bei den Patienten mit dem metastasierenden oder nicht-resezierbaren Tumor wurden durchgeführt. Die objektive Ansprechrates wurde bei ungefähr 12 % der Patienten gesehen, und bei weiteren 35 % wurde die Stabilisierung der Krankheit festgestellt. Es soll die klinische Phase III folgen, in der ein Vergleich mit der Paclitaxel-Therapie untersucht wird (Garbe *et al.* 2011; Kirkwood *et al.* 2011).

Es wurde viel getan im Forschungsbereich der Melanom-Therapie in den letzten Jahren. Vor allem eine „maßgeschneiderte“, also auf den Patienten abgestimmte Tumor-Behandlung weckt Hoffnung auf Erfolg. Die volle Genesung der Patienten mit Melanom im fortgeschrittenen Stadium bleibt dennoch, trotz der Entwicklung von neuen Therapien, oft unerreichbar. Die Grundlagenforschung, welche die molekularen Hintergründe für die Planung der Antitumor-Medikamente liefert, ist hier von großer Bedeutung.

### 1.2.3 Die Rolle von Apoptose und von Proteinen der Bcl-2-Familie bei der Carcinogenese

Eines der Merkmale der Tumorentwicklung ist eine erfolgreiche Umgehung des Schutzmechanismus Apoptose (Hanahan und Weinberg 2000). In den maligne transformierten Zellen werden Mechanismen aktiviert, welche zur Unterdrückung des für sie vorgesehenen apoptotischen Zelltodes führen. Dadurch bauen die Tumorzellen eine Resistenz gegen intrinsische und extrinsische Todessignale auf und können eine Eliminierung der beschädigten und potentiell tumorigenen Zellen vermeiden. Die Verbindung zwischen dem apoptotischen Signalweg und der Kanzerogenese wurde ein paar Jahre nach der Entdeckung von Bcl-2 (Tsujimoto *et al.* 1985) durch die Arbeit von David Vaux nachgewiesen (Vaux *et al.* 1988). Um der Apoptose zu entkommen, führt ein Weg über die Überexpression der anti-apoptotischen Proteine oder über die Inaktivierung der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie. Infolgedessen werden die Bcl-2-artigen Proteine als potentielle Onkoproteine gesehen, während die Bax/Bak-like und die BH3-only Proteine die Rolle der Tumorsuppressoren übernehmen.

Tatsächlich wurden hohe Expressionsspiegel von Bcl-2 nicht nur im humanen folliculären Lymphom, sondern auch zusammen mit dem anti-apoptotischen Mitglied Bcl-x<sub>L</sub> in den anderen Tumorarten wie Brustkrebs, der akuten promyelozytischen Leukämie oder Pankreaskrebs vorgefunden (Coultas und Strasser 2003). Oft sind in den malignen Zellen nicht die Bcl-2-artigen-Gene selbst mutiert, sondern eher andere Gene, deren Produkte die Mitglieder der Bcl-2-Familie regulieren. Beispielsweise die häufig in Tumoren vorgefundene Hyperaktivität des NF-κB-Signalweges kann zur erhöhten Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und A1 führen (Grumont *et al.* 1999). Nachdem die maligne Transformation mehrere Mutationen oder im Allgemeinen genomische Änderungen erfordert, ist die Tatsache, dass Translokationen des *bcl-2*-Gens selten alleine vorkommen, nicht überraschend. Die Zusammenarbeit von Bcl-2 und dem Transkriptionsfaktor Myc (auch c-Myc genannt; *avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*) wurde das erste Mal in den Eμ(*immunoglobulin heavy chain enhancer*)-Bcl-2/Eμ-Myc-doppel-transgenen Mäusen beobachtet. Diese lymphoiden Tumore entwickeln sich schneller als in einfach-transgenen Tieren (Strasser *et al.* 1990). Es folgten weitere Studien, die bestätigten, dass die Kollaboration zwischen der Blockierung der Apoptose durch Bcl-2 und der Förderung der Zellproliferation durch Myc hoch tumorigen ist (Naik *et al.* 1996; Jager *et al.* 1997; Pelengaris *et al.* 2002).

Nicht nur die Überexpression der anti-apoptotischen Proteine kann zur Entwicklung von Malignität beitragen, sondern auch die Abwesenheit von den Effektoren Bax/Bak. Es wurde berichtet, dass die Mutation oder der Verlust von *Bax* zur Entwicklung von Kolonkrebs, Brustkrebs sowie Gehirntumoren beitragen kann (Rampino *et al.* 1997; Yin *et al.* 1997;

Shibata *et al.* 1999). Nachdem es aber eine gewisse funktionelle Redundanz zwischen Bax und Bak gibt (Lindsten *et al.* 2000), ist die tumorigene Auswirkung einer Mutation oder Deletion in einem der Effektor-Gene Signal- und Zelltyp-spezifisch (diskutiert in (Cory *et al.* 2003)).

Ein funktioneller Verlust der pro-apoptotischen BH3-only Proteine kann ebenfalls zur Tumorigenese beitragen. Wie bereits im Kapitel 1.1.3.3 erwähnt, hängt die Ausführung der DNA-Schäden-abhängigen Apoptose von dem Tumorsuppressor p53 ab. Mutationen bzw. Deletionen des *p53*-Gens kommen in über 50 % aller humanen Tumore vor (Hollstein *et al.* 1991). Diese Modifikationen führen u. a. zur Herunterregulation von transkriptionellen p53-Targets wie Puma und Noxa. Der Beweis, dass die Anwesenheit von Puma die Tumorigenese hemmen kann, gab es in einer Studie, in der die Erniedrigung des mRNA-Spiegels von Puma die Myc-vermittelte Lymphomagenese beschleunigte (Hemann *et al.* 2004). *Puma*-defiziente Zellen sind hinsichtlich Zelltod fast so widerstandsfähig gegen DNA-Schäden wie *p53*-defiziente Zellen (Jeffers *et al.* 2003; Villunger *et al.* 2003). Allerdings, entwickeln *Puma*-Null Mäuse spontan keine Tumore, was sie von den *p53*-defizienten Tieren unterscheidet (Adams und Cory 2007). Interessanterweise korrelieren die Puma-Proteinspiegel mit den Entwicklungsstufen des humanen Melanoms. Es wurde berichtet, dass die Puma-Expression in den primären malignen Melanomen, im Vergleich zu den benignen Nävi reduziert ist. Darüber hinaus war die stärkste Herunterregulation dieses BH3-only Proteins in metastasierenden Melanomen vorzufinden (Karst *et al.* 2005). Auch das pro-apoptotische Protein Bim weist tumorhemmende Eigenschaften auf. Nachdem Bim eine essentielle Rolle in der lymphoiden Homöostase spielt, wurde über die Änderungen in der *Bim*-haltigen Chromosomen-Region hauptsächlich in Verbindung mit den hämatopoetischen Malignitäten berichtet (Cory *et al.* 2003). Der Verlust auch nur eines der *Bim*-Allele führt zur gravierenden Beschleunigung der Entwicklung des B-Zell-Lymphoms in den *Myc*-transgenen Mäusen (Egle *et al.* 2004).

Der häufig fehlerhafte apoptotische Signalweg in malignen transformierten Zellen hängt oft mit der Chemotherapie-Resistenz des Tumors zusammen. So kann bspw. der Proteasom-Inhibitor Bortezomib die Sensitivität von Epithelzelltumoren gegenüber Paclitaxel wieder herstellen, indem es die HRAS/MAPK-vermittelte proteasomale Degradation von Bim verhindert (Tan *et al.* 2005). In Melanom- und Myelomzellen dagegen induziert Bortezomib eine Noxa-abhängige (aber p53-unabhängige) Apoptose (Fernandez *et al.* 2005; Qin *et al.* 2005). Nachdem die Mehrheit der klassischen zytotoxischen Agenzien wenig Erfolg in den Tumorzellen erzielt, sollte deshalb eine Strategie zur direkten Induktion von Apoptose versucht werden.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Das maligne Melanom ist der klassischen Chemotherapie gegenüber sehr resistent. Die bösartig transformierten Zellen entwickeln oft Mechanismen, die sie vor Apoptose schützen. Die Überexpression anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie oder eine Hyperaktivität verschiedener Überlebenssignaltransduktionwege gehören zu den Merkmalen der Tumorzellen. In dieser Arbeit sollten verschiedene, mögliche therapeutische Ansätze für die Melanomtherapie getestet werden. Durch eine gezielte Neutralisation der das Überleben fördernden bzw. der die Apoptose hemmenden Faktoren sollte Apoptose in den Melanomzelllinien hervorgerufen werden.

Das schlechte Ansprechen des Melanoms auf die klassischen Chemotherapeutika spiegelt sich in der Resistenz der Melanomzelllinien gegenüber Apoptose durch diese Agenzien *in vitro* wieder. Als erstes sollten die apoptogenen Eigenschaften einer Kombination aus den zwei in der Klinik verwendeten Zytostatika Dacarbazin bzw. Fotemustin und dem Bcl-2-Antagonisten ABT-737 geprüft werden. Darüber hinaus sollten die für die induzierte Apoptose verantwortlichen Proteine aus der Bcl-2-Familie identifiziert werden. Der Mechanismus sollte durch Analyse der mitochondrialen Vorgänge untersucht werden.

Nachdem die Stimulation des Toll-like Rezeptors 3 unter manchen Umständen Apoptose auslösen kann und viele Tumorzellen den Rezeptor exprimieren, sollte auch die Möglichkeit dieser Zelltodinduktion in den Melanomzellen getestet werden. Die Moleküle, die sich an der TLR3-induzierten Apoptose beteiligen, sollten ebenso identifiziert werden.

Die Entdeckung, dass der MAP-Kinasen Signalweg in den meisten Melanomen durch die Mutationen in der Kinase *BRAF* stets eingeschaltet ist, weckt die Hoffnung auf eine erfolgreiche Tumorthherapie durch Inhibition dieses Signalweges. Die Auswirkung der Inhibition dieser Signalkaskade durch die Hemmung einer beteiligten Kinase sollte auf zellulärer sowie Protein-Ebene in dem letzten Teil der Arbeit geprüft werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

##### 2.1.1.1 Wildtyp Melanomzelllinien

Zelllinien	Beschreibung	Herkunft	Quelle
WM35, SBcl2	Melanomzellliniem, gewonnen aus dem Primärtumor in der strahlenförmigen bzw. radialen Wachstumsphase	Mensch	Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute, PA, USA
451Lu, 1205Lu	Melanomzellliniem, metastasierend, selektiert in der murinen Lunge	Mensch/ Maus	Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute, PA, USA

##### 2.1.1.2 Mutationsstatus der WT-Melanomzelllinien

Zelllinie	Mutation BRAF	Mutation NRAS	Mutation p53
WM35	V600E	WT	WT
SBcl2	WT	Q61K	WT
451Lu	V600E	WT	Y220C
1205Lu	V600E	WT	WT

##### 2.1.1.3 Stabile Knock-down Melanomzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Quelle
288	Auf 1205Lu basierende Melanomzelllinie, welche stabil die shRNA mit Kontroll-Sequenz exprimiert („Scrambled“-Sequenz der Bim-mRNA)	Mensch	Dr. Christian Ploner, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich
208	Auf 1205Lu basierende Melanomzelllinie, welche stabil die shRNA gegen die Bim-mRNA exprimiert	Mensch	Dr. Christian Ploner, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich
N8	Auf 1205Lu basierende Melanomzelllinie, welche stabil die shRNA gegen die Noxa-mRNA exprimiert	Mensch	Dr. Arnim Weber, Institut für med. Mikrobiologie, TU München

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Millipore Q-destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden Chemikalien der Firmen Sigma (Deisenhofen, Germany) oder Roth (Karlsruhe, Germany) verwendet.

PBS		Dulbecco's PBS (1 x) (PAA, Pasching, Germany)
Lämmli-Puffer	2,9 g/l 14,4 g/l 1 g/l pH 8,3	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Glycin SDS
Trenngelpuffer	182 g/l 4 g/l pH 8,8	Tris(hydroxymethyl)aminomethan SDS
Sammelgelpuffer	60 g/l 4 g/l pH 6,8	Tris(hydroxymethyl)aminomethan SDS
Laufpuffer (SDS-PAGE)	6 g/l 28,8 g/l 1 g/l	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Glycin SDS
10 x Tris/Glycin	30,3 g/l 144 g/l	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Glycin
Transferpuffer	20 % (v/v) 10 % (v/v)	Methanol 10 x Tris/Glycin
TBS	8 g/l 2,42 g/l pH 7,6	NaCl Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TBS-T	1 x 0,05 % (v/v)	TBS Tween 20



## Material und Methoden

---

Blockierungspuffer	1 x	TBS-T
	50 g/l	Magermilchpulver
Fixierungspuffer	4 % (w/v)	Paraformaldehyd
Lysepuffer (für Gesamtzellextrakte)	20 mM	Tris-HCl pH 7,4
	10 % (v/v)	Glycerol
	135 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	DTT
	1 x	Protease inhibitors (Roche)
	1 % (v/v)	Triton X-100
(für Durchflusszytometrie)	1 x	PBS
	10 g/l	BSA
	10 g/l	Saponin
Blockierungs- und Waschpuffer (für Durchflusszytometrie)	1 x	PBS
	5 % (w/v)	BSA
Digitonin-Puffer	20 mM	HEPES pH 7,2
	100 mM	KCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	250 mM	Sacharose
	1 x	Protease inhibitors (Roche)
	25-150 µg/ml	Digitonin

### 2.1.3 Medien

Melanom-Medium (Tu2%)	80 % (v/v)	MCDB153
	20 % (v/v)	Leibovitz's L-15
	2 % (v/v)	FCS (Biochrom)
	5 µg/ml	Insulin (Bovine)
	1,68 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (Biochrom)

Einfriermedium	60 % (v/v)	Melanom-Medium
	30 % (v/v)	FCS (Biochrom)
	10 % (v/v)	DMSO

### 2.1.4 Kit Systeme

Name	Verwendungszweck	Firma/Quelle
Bio-Rad Protein Assay	Messung der Proteinkonzentration	Bio-Rad (Munich, Germany)
ECL Plus Western Blotting Detection System	Entwicklung der Western Blots	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

### 2.1.5 Antikörper

#### *Primäre Antikörper:*

Name	Klon	Isotyp	Herkunft	Firma/Quelle
A1			Kaninchen	Cell Signalling (Danvers, USA)
Aktive Caspase-3	Mono-C92-605		Kaninchen	BD Pharmingen
Bcl-2	Mono-Bcl-2/100	IgG1	Maus	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany)
Bak	Polyklonal	IgG	Kaninchen	Upstate Biotechnology
Bax	Polyklonal	IgG	Kaninchen	Cell Signalling
Bcl-w	Monoklonal	IgG	Kaninchen	Cell Signalling
Bcl-x <sub>L</sub>	Monoklonal		Maus	BD Pharmingen
Bim	Polyklonal		Kaninchen	Sigma
Bim			Kaninchen	Cell Signalling
Caspase-8	1C12		Maus	Cell Signalling
clAP1			Ratte	Dr. David Vaux (La Trobe University, Victoria, Australia)
clAP2			Kaninchen	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Cytochrom c	Mono-7H8.2C12	IgG2b	Maus	BD Pharmingen
FLIP				BD Biosciences
GAPDH			Maus	Millipore (Schwalbach,

Mcl-1	Monoklonal	IgG1	Maus	Germany) BD Pharmingen
Noxa	Mono- 114C307.1	IgG1	Maus	Alexis (Läufelfingen, Switzerland)
Puma	Polyklonal		Kaninchen	Prosci (Poway, USA)
Tubulin XIAP	Mono-DM 1A	IgG1	Maus	Sigma BD Biosciences

**Sekundäre Antikörper:**

Name	Isotyp	Herkunft	Firma/Quelle
Maus	IgG	Ziege	Dianova
Kaninchen	IgG	Ziege	Sigma
FITC- Kaninchen	IgG	Ziege	Dianova
Cy3- Kaninchen	IgG	Ziege	Dianova
Cy5- Kaninchen	IgG	Ziege	Dianova

**2.1.6 BH3-Peptide**

Die BH3-Peptide Bim WT, Bim  $\Delta\Delta$ , Noxa und Bad (alle human) sind von der Firma Biosynthan GmbH ([www.biosyntan.de](http://www.biosyntan.de)) synthetisiert worden. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie und der Reinheitsgrad mittels HPLC ermittelt. Die Peptide wurden in der lyophilisierten Form geliefert, danach teilweise in 100 %igem DMF gelöst, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die ungelösten Peptide wurden bei -20 °C gelagert.

Die Aminosäure-Sequenzen der Peptide lauten:

Bim WT: MRPEIWIAQELRRIGDEFNA  
 Bim  $\Delta\Delta$ : MRPEIWIAQE-RR-GDEFNA  
 Bad: LWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKG  
 Noxa: AELEVECATQLRRFGDKLNF

**2.1.7 siRNA**

Die siRNAs wurden wie bereits von Ui-Tei und Kollegen beschrieben konzipiert (Ui-Tei *et al.* 2004). Die 3'-Überhänge wurden als dTdT hergestellt. Die nachfolgend beschriebenen spezifischen siRNA-Sequenzen zeigen 19 Nucleotidfolgen in dem kodierenden DNA-Strang der Ziel-mRNA. Die Kontroll-siRNA wurde konzipiert als nicht-herunterregulierende Sequenz,

welche keine Ziel-mRNAs aus dem humanen oder murinen Genom besitzt. Die siRNAs wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Kontrolle: 5'-GCGCAUUC CAGCUUACGUA-3'

Caspase-8: 5'-GCTCTTCCGAATTAATAGA-3'

clAP1: 5'-GGATCCACCTCTAAGAATA-3'

### 2.1.8 Chemotherapeutika und andere proapoptotische Stimuli

Name	Beschreibung	Quelle/Firma
Fotemustin (Muphoran®)	Zytostatikum aus der Gruppe der Nitroharnstoffe	Servier Deutschland GmbH
Dacarbazin	Zytostatikum aus der Gruppe Alkylantien	Sigma, München, Deutschland
Poly I:C	Polyinosinische:polycytidylische Säure, synthetischer Analogon der dsRNA, Ligand des TLR3	Sigma
Poly A:U	Polyadenylische:polyuridylische Säure, synthetischer Analogon der dsRNA, Ligand des TLR3	Dr. Stefan Bauer, Philipps-Universität, Marburg, Deutschland
CT98014	Inhibitor der Glykogen Synthase Kinase 3	Axon Medchem, Groningen, Holland
LBW242	Smac-Mimetikum, IAP-Inhibitor	Dr. Leigh Zewel, Novartis
ABT-737	Bcl-2-Antagonist, Inhibitor der Bcl2-artigen Proteine: Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> und Bcl-w	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Melanomzellen wurden in dem oben beschriebenen TU2% Medium kultiviert und in einem befeuchteten Brutschrank bei 37 °C mit 5 %-igem CO<sub>2</sub>-Gehalt gelagert. Es wurde eine 1 %-ige Trypsin-EDTA-Lösung verwendet, um die Zellen zu ernten und zu passagieren. Nach ca. 10 min wurde das Trypsinieren der Zellen mit TU2 % Medium gestoppt, dabei wurden die Zellen mehrmals resuspendiert, um die Zellklumpen zu lösen. Die gewünschte Menge an Zellen wurde dann für die Experimente in die gewünschten Zellkulturplatten ausgesetzt. Ein Teil der Zellen wird für die weitere Kultivierung verwendet. Nach 4 bis 6 Wochen wurden die Zellen durch frische eingefrorene Zell-Stocks ersetzt.

Für die Langzeitaufbewahrung werden die Zellen, wie oben bereits beschrieben, geerntet und im Einfriermedium aufgenommen. Danach werden die Zellen bei -80 °C eingefroren und später evtl. im flüssigen Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

Für das Verwenden der eingefrorenen Zellen werden diese im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut, mit dem Kulturmedium gewaschen und in die Platten gesetzt.

Die Zellen wurden normalerweise 1 Tag vor dem geplanten Experiment ausgesetzt.

### 2.2.2 Herstellung der Gesamtzellextrakte

Für die Herstellung der Gesamtzellextrakte werden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und der Zellpellet in 20-30 µl Lysepuffer aufgenommen. Die Zellen werden 30 min auf Eis inkubiert und ein bis zwei Mal gevortext. Danach werden die Zelllysate bei 2200 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und die Pellets verworfen. Die Proteinkonzentration der Lysate wird mittels der Bradford-Methode ermittelt (2.2.3) und die Proben entweder eingefroren oder sofort für die SDS-PAGE (2.2.4) verwendet.

### 2.2.3 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wird nach der Bradford-Methode bestimmt. Dazu wird das Bio-Rad Protein Assay Reagenz verwendet. Für die Erstellung der Standardkurve wird Albumin aus Rinderserum (*bovine serum albumin*, BSA) benutzt.

### 2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in den Gesamtzellextrakten vorhandenen Proteine können mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu werden SDS-Gele auf die „klassische“ Weise, wie unten beschrieben, zusammengesetzt und gegossen. Die Volumina sind für 5 Gele ausreichend.

Trenngel	15 %	12,5 %	Sammelgel	
Trenngelpuffer (ml)	7,5	7,5	Sammelgelpuffer (ml)	3,75
Acrylamid (ml)	15	12,6	Acrylamid (ml)	2,4
H <sub>2</sub> O (ml)	7,5	9,9	H <sub>2</sub> O (ml)	13,8
APS 10 % (µl)	180	180	APS 10 % (µl)	70
TEMED (µl)	30	30	TEMED (µl)	30

Das zweite verwendete System basiert auf den halbfertigen SDS-Gelen EZ-Run™ von Fisher Scientific. In der Gellösung befinden sich alle Bestandteile des SDS-Gels außer TEMED und APS, die frisch dazugegeben werden. Für je 10 ml der Gellösung werden 6 µl TEMED und 60 µl APS vermischt.

Bevor die Zellysate auf die Gele geladen werden, müssen diese mit Lämmli-puffer versetzt und bei 95 °C für ca. 5 min aufgekocht werden. Als Proteinstandard, um die Molekulargewichte der Proben zu vergleichen, wird Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad) oder PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Gele werden bei 110-180 V laufengelassen, bis die blaue Front das Gel verlässt. Danach werden die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgt bei 100 V und 4 °C und dauert zwischen 45 min und 1,5 h (je nach Proteingröße). Dazu wird entweder die Nitrocellulose-Membran von Whatman oder die PVDF-Membran von GE Healthcare benutzt. Nach dem Blotten werden Proteine mittels Western Blot spezifisch nachgewiesen.

### **2.2.5 Western Blot**

Nach der Auftrennung via SDS-PAGE können die Proteine spezifisch mittels der Western Blot Methode nachgewiesen werden. Dabei werden die Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose (Protran, Whatman) bzw. PVDF (GE Healthcare) Membran im elektrischen Feld bei 100 V für 45 min bis 1,5 h bei 4 °C transferiert. Die Membranen werden mit der 5 %-igen Magermilch (5 %-iges Magermilchpulver gelöst in TBS-T) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C blockiert. In der Regel werden die primären Antikörper wie von der Herstellerfirmen empfohlen angewendet. Der Antikörper wird in der 5 %-igen Magermilch bzw. in der 5 %-igen BSA/TBS-T-Lösung verdünnt und mit der Membran bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wird die Membran jeweils drei Mal 10 min mit TBS-T gewaschen und mit dem HRP-konjugierten, sekundären Antikörper weitere 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wird die Membran zweifach mit TBS-T und ein Mal mit TBS gewaschen. Die Proteine werden mittels Chemilumineszenz detektiert (chemiluminescence detection system, PerkinElmer Life Sciences oder ECL Plus Western Blotting Detection System GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

### **2.2.6 Strippen von Membranen**

Um auf der Membran zusätzliche Proteine zu detektieren, wird diese 15 bis 30 min bei RT mit 0,2 M NaOH Lösung behandelt um die alten Antikörper zu entfernen. Danach wird die Membran mit Milli-Q H<sub>2</sub>O zwei Mal gewaschen, mit Magermilch blockiert und mit den entsprechenden Antikörper, wie oben bereits beschrieben, inkubiert.

### **2.2.7 Protein-Herunterregulation mittels RNAi**

Ein Tag vor dem geplanten Experiment werden  $0,1 \times 10^6$  Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesetzt. Am Tag der Herunterregulation wird das Medium der zu behandelnden Zellen durch das Antibiotika-freie Medium ersetzt (1,25 ml pro Well). Es werden 1,5 µl 20 µM siRNA

und 1,25 µl RNAiMAX (Invitrogen) separat in jeweils 125 µl FCS-freiem OptiMEM verdünnt. Danach werden die zwei Verdünnungen vorsichtig vermischt (Gesamtvolumen 250 µl) und 15 min bei RT inkubiert. Schließlich wird die siRNA-RNAiMAX-Mischung vorsichtig in die einzelne Wells pipettiert (Gesamtvolumen im Well 1,5 ml). Nach 24 h bzw. 48 h werden die Zellen mit entsprechenden Stimuli behandelt oder geerntet, um den Knock-down der Proteine mittels Western Blot nachzuweisen.

## 2.2.8 Induktion von Apoptose

Um die Apoptose zu induzieren (bzw. zu hemmen), werden die Zellen ein Tag nach dem Aussetzen mit folgenden Stimuli behandelt.

Name	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Fotemustin	50 mg/ml in 83,75 % Ethanol	50 µg/ml
Dacarbazin	50 mg/ml in 1 M HCl	300 µg/ml
Poly I:C	2,5 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Poly A:U	2,5 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
LBW242	10 mM in DMSO	10 µM
ABT-737	5 mM in DMSO	1 µM
Cycloheximid	10 mM	2,5 µM
zVAD-fmk	100 mM in Ethanol	50 µM
UO126	10 mM in DMSO	10 µM

Apoptotische Zellen werden zwischen 6 und 72 h nach der Stimulation mittels der Durchflusszytometrie detektiert. Um die Hoch- und/oder Herunterregulation von Proteinen nach der Anwendung der verschiedenen Stimuli festzustellen, werden Gesamtzellextrakte aus den behandelten Zellen hergestellt. Eventuell werden die Zellen nach der Stimulation geerntet und für den Cytochrom c-Freisetzungssassay verwendet.

## 2.2.9 Apoptoseassays

### 2.2.9.1 Durchflusszytometrische Analyse

#### 2.2.9.1.1 *Färbung der aktiven Caspase-3*

Die stimulierten Zellen werden geerntet und mit 4 %-igem Formaldehyd bei RT für 20-30 min fixiert. Die fixierten Zellen werden dann dreifach mit PBS gewaschen und entweder sofort gefärbt oder bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert. Vor der Färbung werden die Zellen mit dem Blockierungspuffer (0,5 % BSA in PBS) und dann mit Permeabilisierungspuffer (0,5 % Saponin und 0,5 % BSA in PBS) jeweils einmal gewaschen. Danach werden die Zellen mit

dem primären Antikörper aus dem Kaninchen, der die aktive Caspase-3 bindet (Abcam bzw. BD Biosciences), im Verhältnis 1:500 in Permeabilisierungspuffer bei RT 30-40 min inkubiert. In der Folge werden die Zellen dreifach mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper aus der Ziege, der den Kaninchen-Antikörper bindet und mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 gekoppelt ist, im Dunkeln bei RT für 20-30 min inkubiert.

### *2.2.9.1.2 Propidium Iodid Färbung*

Die stimulierten Zellen werden geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Dann werden die Proben in 5 µg/ml Propidium Iodid-Lösung in PBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie auf den Zelltod getestet.

### *2.2.9.2 Cytochrom c-Freisetzung*

Unbehandelte oder stimulierte 1205Lu Melanomzellen ( $0,15 - 0,2 \times 10^6$  Zellen pro Probe) werden geerntet, mit PBS gewaschen und in 50 µl Digitoninpuffer resuspendiert. Zusätzlich werden die Zellen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit der BH3-Peptide (100 µM) oder ABT-737 (50 µM) bei 30 °C für 60 min inkubiert. Danach werden die permeabilisierten Zellen bei 13000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert um die Mitochondrien enthaltenden Pellets und Überstände zu separieren. Zu den Überständen wird 6 x Lämmli-puffer gegeben, während die Pellets in gleichen Volumina des 1 x Lämmli-puffers aufgenommen werden. Die Proben werden für die SDS-PAGE vorbereitet.



## 3 Ergebnisse

### **3.1 Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz des Bcl-2-Antagonisten ABT-737 und verschiedener Chemotherapeutika**

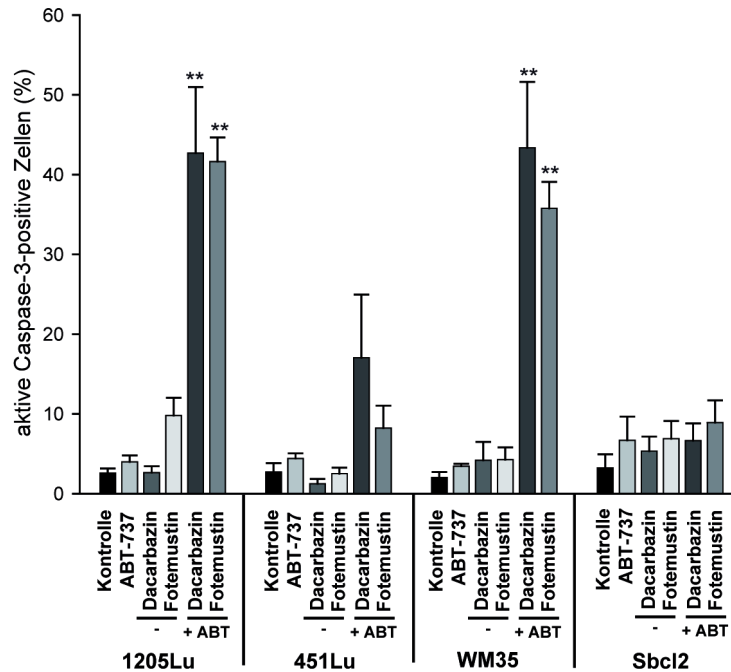
Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist das maligne Melanom gegen die klassische Chemotherapie sehr resistent (s. Kapitel 1.2.2). Demzufolge weisen viele Zelllinien, welche aus Melanom-Patienten gewonnen wurden, ebenfalls eine sehr geringe Sensitivität den zytotoxischen Agenzien gegenüber auf. Auch von der Resistenz der Melanomzelllinien gegen die Monotherapie mit dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 wurde bereits berichtet (Miller *et al.* 2009). Nachdem ABT-737 die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-w und Bcl-x<sub>L</sub> bindet (s. Kapitel 1.1.3.5), wäre eine Kombination aus ABT-737 und einem anti-neoplastischen Agent, das vor allem Mcl-1 neutralisiert, von großem Interesse (s. Kapitel 1.1.3.2). Dacarbazin und Fotemustin sind Zytostatika (s. Kapitel 2.1.8), die in der klinischen Behandlung gegen das maligne Melanom verwendet werden. Deren genauer molekularer Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Eine eventuelle Sensibilisierung der Melanomzellen mit ABT-737 für die Behandlung mit den oben erwähnten Chemotherapeutika wurde hier getestet. Die molekularen Hintergründe der Sensitivität bzw. der Resistenz der verwendeten Zelllinien wurden ebenfalls untersucht. Außerdem wurde die Freisetzung von Cytochrom *c* nach den verschiedenen Behandlungen auf der mitochondrialen Ebene überprüft.

#### **3.1.1 Stimulation von Melanomzellen mit der Kombination aus Fotemustin oder Dacarbazin mit ABT-737**

Vier verschiedene Melanomzelllinien, ursprünglich gewonnen aus den menschlichen Hauttumoren, wurden auf ihre apoptotische Empfindlichkeit für zwei verschiedene chemotherapeutische Agenzien Fotemustin und Dacarbazin getestet. Diese Zytostatika wurden alleine sowie in Kombination mit dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 verwendet. Der apoptotische Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Es wurden entweder die Zellen, welche die aktive Form der Caspase-3 (Abbildung 9) besitzen oder welche, die eine desintegrierte Zellmembran aufweisen (Abbildung 10), Fluoreszenz-markiert.

Die Zelllinien 1205Lu, 451Lu, WM35 und Sbcl2 wurden mit Fotemustin, Dacarbazin und ABT-737 alleine sowie in Kombination stimuliert (Abbildung 9). Alle Melanomzelllinien zeigten nach 24 h große Resistenz auf Einzelstimulation, sodass die gemessenen apoptotischen Zellen nicht 10 % der Gesamtpopulation überschritten. Im Gegensatz dazu

verursachte die Kombination aus Fotemustin bzw. Dacarbazin mit ABT-737 in zwei von vier getesteten Zelllinien (1205Lu und WM35) eine signifikante, synergistische Erhöhung der nach 24 h gemessenen Apoptose bis auf ca. 40 % (Abbildung 9).



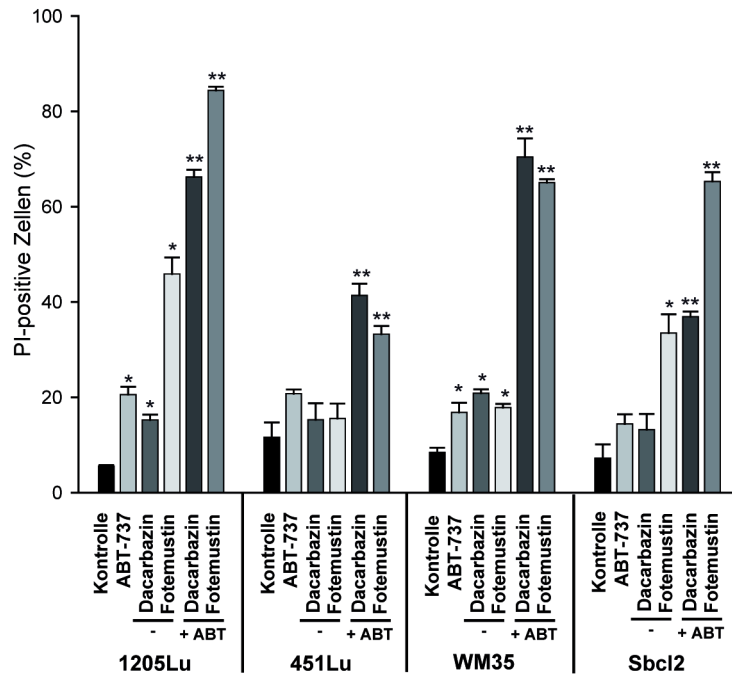
**Abbildung 9: Apoptoseinduktion in Melanomellen durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin oder Dacarabazin mit ABT-737 nach 24 h.**

Melanomzellen wurden für 24 h mit Ethanol, HCl und DMSO (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737, 300  $\mu$ g/ml Dacarbazin oder 50  $\mu$ g/ml Fotemustin bzw. der Kombination aus den beiden Chemotherapeutika und dem Bcl-2-Antagonist stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der Caspase-3-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \*\*  $P < 0,05$  im Vergleich zur Einzelstimulation mit Fotemustin oder Dacarbazin.

Nach 48 h (Abbildung 10) konnte man im Allgemeinen eine erhöhte Anzahl an PI-positiven Zellen im Vergleich zum 24 h-Zeitpunkt feststellen. In drei der getesteten Zelllinien (alle außer 451Lu) konnte eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen nach der Stimulation mit Fotemustin beobachtet werden (bei 1205Lu bis auf über 45 %). Monobehandlungen mit ABT-737 und Dacarbazin lösten signifikant erhöhte Apoptose in zwei der getesteten Zelllinien (1205Lu und WM35) aus, der Prozentsatz der toten Zellen blieb jedoch bei höchstens 20 %. Die Kombinationsstimulation aus beiden Chemotherapeutika entweder Fotemustin oder Dacarbazin mit dem Bcl-2-Antagonist führte zum synergistischen Anstieg der Apoptose in allen Zelllinien und erreichte nach 48 h bis zu über 80 % (bei der Zelllinie 1205Lu).

Um die Wirkung der verwendeten Chemotherapeutika auf der Proteinebene zu beobachten, wurden Gesamtzellextrakte aus den mit Dacarbazin oder Fotemustin stimulierten 1205Lu und 451Lu Zellen erzeugt und mittels SDS-PAGE auf dem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Danach wurden die Proben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die gewünschten Proteine mittels Western Blot visualisiert (Abbildung 11, links). Außerdem wurde die *de novo* Geninduktion von Noxa überprüft, indem die Zellen erst mit Cycloheximid (CHX) und erst dann mit Dacarbazin bzw. Fotemustin behandelt worden sind (Abbildung 11, rechts).

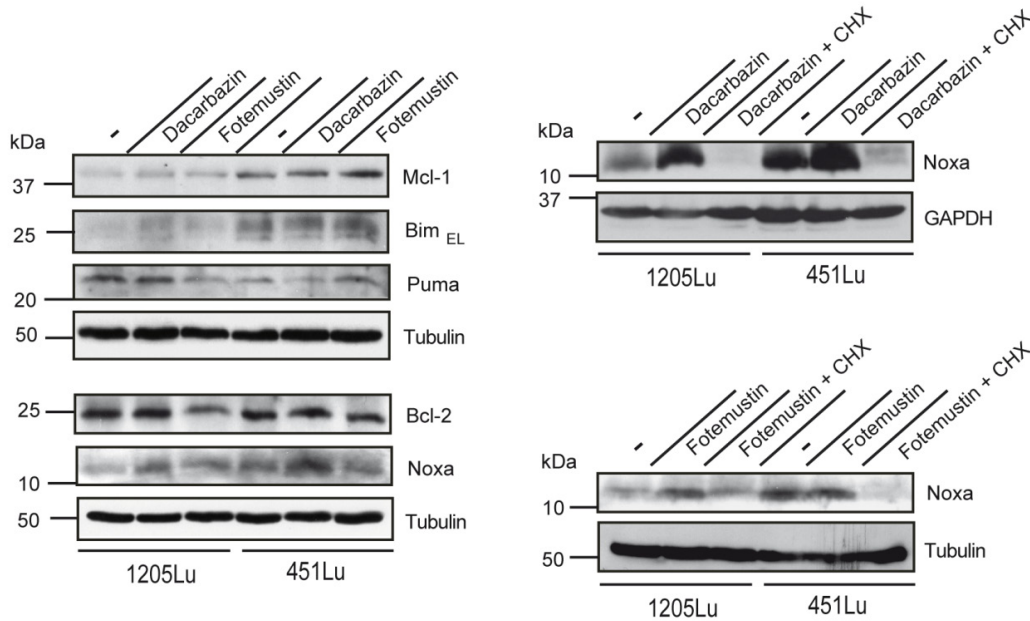


**Abbildung 10: Apoptoseinduktion in Melanomellen durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin oder Dacarbazin mit ABT-737 nach 48 h.**

Melanomzellen wurden für 48 h mit Ethanol, HCl und DMSO (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737, 300  $\mu$ g/ml Dacarbazin oder 50  $\mu$ g/ml Fotemustin bzw. der Kombination aus den beiden Chemotherapeutika und dem Bcl-2-Antagonist stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0,05$  im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle; \*\*  $P < 0,05$  im Vergleich zur Einzelstimulation mit Fotemustin oder Dacarbazin.

Wie in der Abbildung 11 (links) gezeigt, konnten keine bedeutsamen Änderungen in der Proteinmenge von Puma, Bcl-2 oder Mcl-1 nach der Stimulation weder mit Dacarbazin noch mit Fotemustin nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der Zelllinie 451Lu, zeigten die 1205Lu-Zellen einen leicht erhöhten Proteinspiegel von Bim nach der Behandlung mit Dacarbazin, aber nicht mit Fotemustin. In beiden untersuchten Zelllinien wurde eine Hochregulation von Noxa durch die Verwendung von Dacarbazin nachgewiesen. In den 1205Lu-Zellen konnte eine ähnliche Beobachtung nach der Stimulierung mit Fotemustin, allerdings in kleinerem Ausmaß, gemacht werden (s. Abbildung 11 links). Die erwähnte Hochregulation von Noxa wurde zusätzlich in der Abbildung 11 (rechts im Bild) bestätigt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die erhöhte Noxa-Proteinmenge durch die *de novo*

Geninduktion zu Stande kam, da die Vorstimulation mit CHX diese fast vollständig blockieren konnte.



**Abbildung 11: Einfluss der Stimulation mit Dacarbazin oder Fotemustin auf die Proteinexpression der Mitglieder der Bcl-2-Familie in Melanomzellen.**

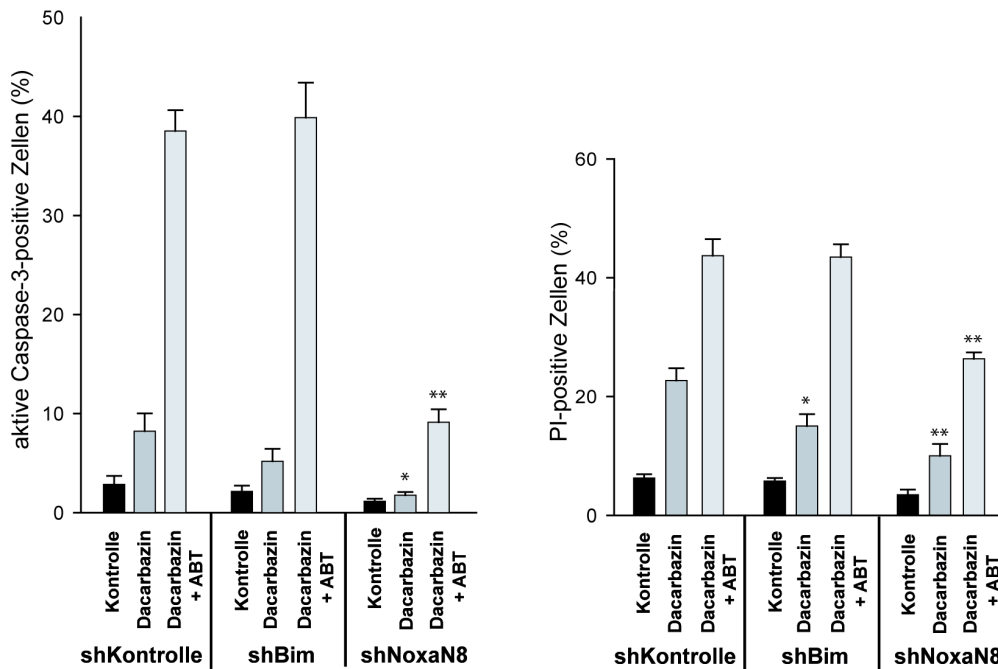
1205Lu und 451Lu Melanomzellen wurden mit 50 µg/ml Fotemustin oder 300 µg/ml Dacarbazin stimuliert. Ein Teil der Proben (rechts im Bild) wurde zusätzlich zuerst mit 2,5 µg/ml Cycloheximid behandelt. Nach 24 h wurden die Gesamtzellextrakte gewonnen und die Proben via SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blot wurden schließlich die gewünschten Proteine detektiert; Tubulin und GAPDH dienten als Ladekontrolle. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse konnten in 2 unabhängigen Versuchen verifiziert werden. Unbehandelte Kontrolle (-).

### 3.1.2 Stimulation von Melanomzellen nach RNAi gegen Bcl-2-Proteine

Um den möglichen Einfluss der BH3-only Proteine Bim und Noxa auf den apoptotischen Zelltod durch Fotemustin bzw. Dacarbazin mit ABT-737 genauer zu untersuchen, wurden stabile Knock-down 1205Lu Melanomzelllinien verwendet (hergestellt von Dr. Arnim Weber, Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München). Diese exprimieren eine „short-hairpin“ RNA (shRNA), welche die mRNA von Noxa bzw. Bim andauernd degradiert. Die Kontrollzelllinie (shScrambled) exprimiert dagegen eine nicht-herunterregulierende RNA Sequenz (eine „durcheinander gebrachte“ Bim-shRNA Sequenz), die kein mRNA-Ziel besitzt.

Die Knock-down Zellen wurden entweder mit dem Lösungsmittel, Dacarbazin oder der Kombination aus Dacarbazin und ABT-737 stimuliert. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde nach 24 h (Färbung der aktiven Caspase-3; links im Bild) bzw. 48 h (PI-Färbung; rechts im Bild) mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 12). Nach 24 h zeigten die Kontrollzellen sowie die shBim-Zellen eine relativ kleine Apoptoserate von unter 10 % nach der Stimulation mit Dacarbazin. Die Kombinationsbehandlung mit Dacarbazin und ABT-737

ergab dagegen bei den Zellen eine Sterberate von ca. 40 %. Die shNoxa-Zellen zeigten nach 24 h sowie 48 h jedoch einen signifikant verringerten apoptotischen Zelltod nach der Einzelbehandlung mit Dacarbazin und nach der Kombinationsstimulierung mit ABT-737 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der Knock-down von Bim führte nur im Fall der Einzelbehandlung mit Dacarbazin nach 48 h zu einer geringeren Apoptoserate. Die verringerte Proteinmenge von Bim hatte weder nach 24 h noch nach 48 h einen Einfluss auf die durch Kombinationsstimulation resultierende Apoptose.

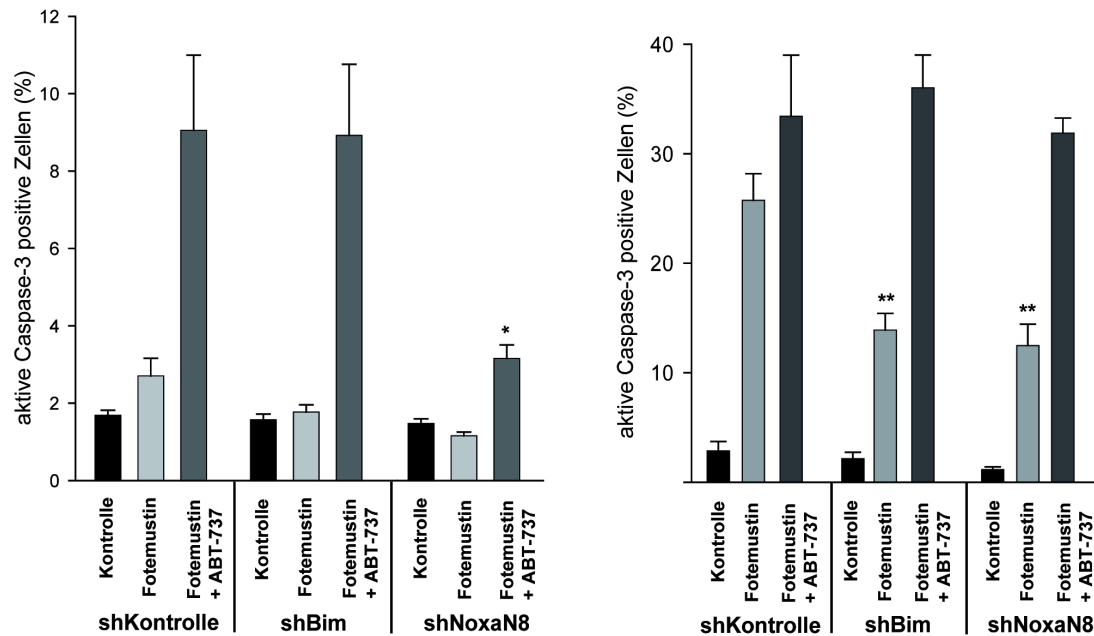


**Abbildung 12: Apoptoseinduktion in Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Dacarbazin und ABT-737.**

Die 1205Lu-KD-Zellen wurden entweder für 24 h (links) oder 48 h (rechts) mit HCl und DMSO (Kontrolle), 300 µg/ml Dacarbazin oder der Kombination aus dem Chemotherapeutikum und ABT-737 (1 µM) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als prozentualer Anteil der Caspase-3-positiven Zellen (links) oder der PI-positiven Zellen (rechts) im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05; \*\* P < 0,005 im Vergleich zur gleichen Stimulation der Kontrollzellen.

Die Behandlung der 1205Lu Knock-down Zellen mit Fotemustin und ABT-737 brachte ähnliche, aber nicht identische Ergebnisse (Abbildung 13). Nach 24 h wurde bei den Kontrollzellen eine Apoptoserate von ca. 25 % nach der Einzelstimulation mit Fotemustin und über 30 % im Fall der Kombinationsbehandlung nachgewiesen (Abbildung 13, rechts). Der Knock-down von den beiden BH3-only Proteinen Bim und Noxa hat keinen Einfluss auf die durch Kombinationsstimulation sterbenden Zellen. Nur wenn Fotemustin alleine verwendet wurde, zeigten die beiden Knock-down Zelllinien eine signifikant verringerte Aktivität der Caspase-3. Der apoptotische Zelltod, der durch die Kombination aus Fotemustin und ABT-

737 nach 24 h ausgelöst wurde, konnte durch die Herunterregulation weder von Bim noch von Noxa gehemmt werden. Aus diesem Grund wurde ein früherer Zeitpunkt von 6 h betrachtet. Es konnte ein signifikanter Schutz vor Fotemustin/ABT-737-induzierter Apoptose in Abwesenheit von Noxa beobachtet werden (Abbildung 13, links).



**Abbildung 13: Apoptoseinduktion in Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin und ABT-737.**

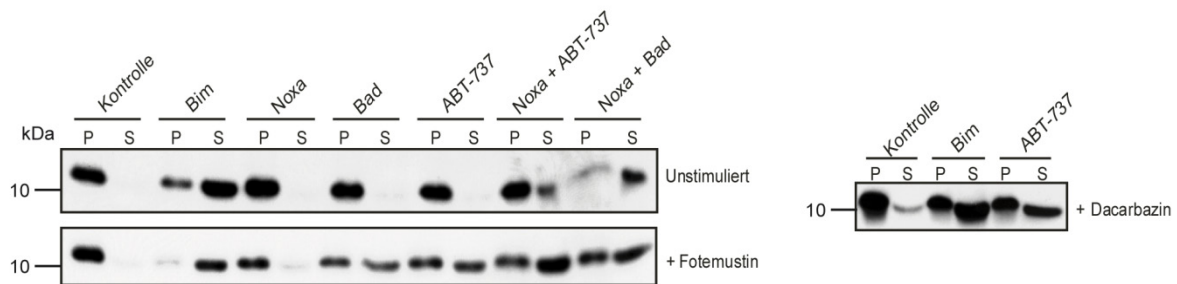
Die Zellen wurden entweder für 6 h (links) oder 24 h (rechts) mit dem Ethanol und DMSO (Kontrolle), 50 µg/ml Fotemustin oder der Kombination aus dem Chemotherapeutikum und ABT-737 (1 µM) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der Caspase-3-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05; \*\* P < 0,005 im Vergleich zur gleichen Stimulation der Kontrollzellen.

### 3.1.3 Freisetzung von Cytochrom c durch den kombinierten Einsatz von Fotemustin oder Dacarbazin mit ABT-737

Die Fähigkeit Apoptose auszulösen durch die Kombinationsstimulation von Fotemustin bzw. Dacarbazin, wurde anhand der Cytochrom c-Freisetzung getestet. Bei diesem Assay wurden die 1205Lu-Zellen mit Fotemustin bzw. Dacarbazin für 24 h vorstimuliert, danach mit Digitonin permeabilisiert und schließlich mit verschiedenen BH3-Peptiden und/oder ABT-737 inkubiert.

In dem Cytochrom c-Freisetzungsassay wurde das Lösungsmittel als die negative Kontrolle und der BH3-Peptid von Bim als die positive Kontrolle verwendet. Aus den Mitochondrien der Kontrollzellen konnte die Freisetzung des Cytochroms c im Fall der BH3-Peptiden von Bim und der Kombination von Noxa und Bad sowie Noxa und ABT-737 beobachtet werden. Die Verwendung der BH3-Peptiden von Noxa und Bad sowie ABT-737 führte dagegen in den

unstimulierten Zellen zu keiner Freisetzung des apoptogenen Proteins (Abbildung 14, oben links). Bei den mit Fotemustin vorstimulierten Zellen wurde Cytochrom *c* mit Hilfe von den gleichen Stimuli wie bei den Kontrollzellen freigesetzt. Zusätzlich konnte in den mit Fotemustin vorbehandelten Zellen nach der Inkubation mit jeweils Bad-BH3-Peptid und ABT-737 eine Permeabilisierung der Mitochondrien nachgewiesen werden. Nach der Vorstimulation mit Dacarbazin konnte in ähnlicher Weise die Freisetzung vom Cytochrom *c* nach der Verwendung des Bim-BH3-Peptids und ABT-737 als Einzelstimuli festgestellt werden.



**Abbildung 14: Freisetzung des Cytochroms *c* aus den Mitochondrien der 1205Lu Zellen durch BH3-Peptide und ABT-737 nach der Vorstimulierung mit Fotemustin bzw. Dacarbazin.**

Die Zellen wurden mit den Lösungsmitteln (Ethanol + HCl, unstimuliert), 50 µg/ml Fotemustin oder 300 µg/ml Dacarbazin für 24 h stimuliert, danach mit Digitonin permeabilisiert und bei 30 °C für 60 min mit 100 µM angegebenen BH3-Peptiden bzw. 50 µM ABT-737 oder DMSO (Kontrolle) inkubiert. Die Proben wurden dann zentrifugiert, um die mitochondrialen (P, *pellet*) und zytosolischen (S, *supernatant*) Fraktionen voneinander zu trennen. Die gewonnenen Proben wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Schließlich wurde die Lokalisation des Cytochroms *c* mittels Western Blot durch die Verwendung des geeigneten Antikörpers detektiert. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse konnten in 2 unabhängigen Versuchen verifiziert werden.

### **3.2 Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch die Stimulation des Toll-like Rezeptors 3 mit Poly I:C und Inhibition der IAPs mit dem Smac-Mimetikum LBW242**

Die Stimulierung von TLR3 kann unter Umständen Apoptose auslösen. Viele Tumorzellen, auch Melanomzellen, exprimieren TLR3 auf den Membranen ihrer intrazellulären Kompartimenten (s. Kapitel 1.1.5.1). Diese Tatsache macht sie anfällig für die Induktion des apoptotischen Signalweges mit Hilfe von verschiedenen TLR3-Liganden wie bspw. Poly I:C. In den meisten Fällen wird die TLR3-vermittelte Apoptoseinduktion erst durch die Anwendung von verschiedenen Zusatz-Agenzien ermöglicht (Salaun *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2008). Hier wurde die Sensitivität der Melanomzellen auf Poly I:C getestet. Zusätzlich wurde die eventuelle Verstärkung der apoptotischen Antwort durch die Verwendung von Cycloheximid (CHX) und dem Smac-Mimetikum LBW242 überprüft. Auch die Rolle der Proteine aus der Bcl-2-Familie, der IAPs und der anderen Proteine des apoptotischen

Signalweges wurde in dem Poly I:C/CHX- und Poly I:C/LBW242-vermittelten apoptotischen Zelltod untersucht.

### **3.2.1 Stimulation der Melanomzellen mit der Kombination von Poly I:C und Cycloheximid**

In vorausgegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe haben wir gezeigt, dass ein synthetischer TLR3-Ligand Poly I:C alleine in der Lage ist, den apoptotischen Zelltod in humanen HaCaT Keranozyten auszulösen (Weber *et al.* 2010). Nach 24 h waren fast 50 % der HaCaTs, wenn mit der höchsten Konzentration von Poly I:C stimuliert, Caspase-3-positiv. Diese Möglichkeit, die Apoptose durch die Stimulation von TLR3 zu induzieren, wurde anschließend in den Melanomzelllinien untersucht. Es konnte allerdings nur eine geringe Anzahl an sterbenden Zellen nach der Behandlung mit Poly I:C (höchstens ca. 10 %) beobachtet werden, trotz der nachgewiesenen TLR3-Expression (Weber *et al.* 2010). Da es schon erfolgreiche Versuche gab, die Poly I:C-resistenten Zellen zusätzlich mit dem Inhibitor der Proteinbiosynthese Cycloheximid zu behandeln (Jiang *et al.* 2008), wurde in diesem Fall ein gleiches Vorgehen gewählt.

Dazu wurden vier Melanomzelllinien mit Poly I:C und Cycloheximid alleine und in Kombination (mit und ohne den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde nach 24 h durch die PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

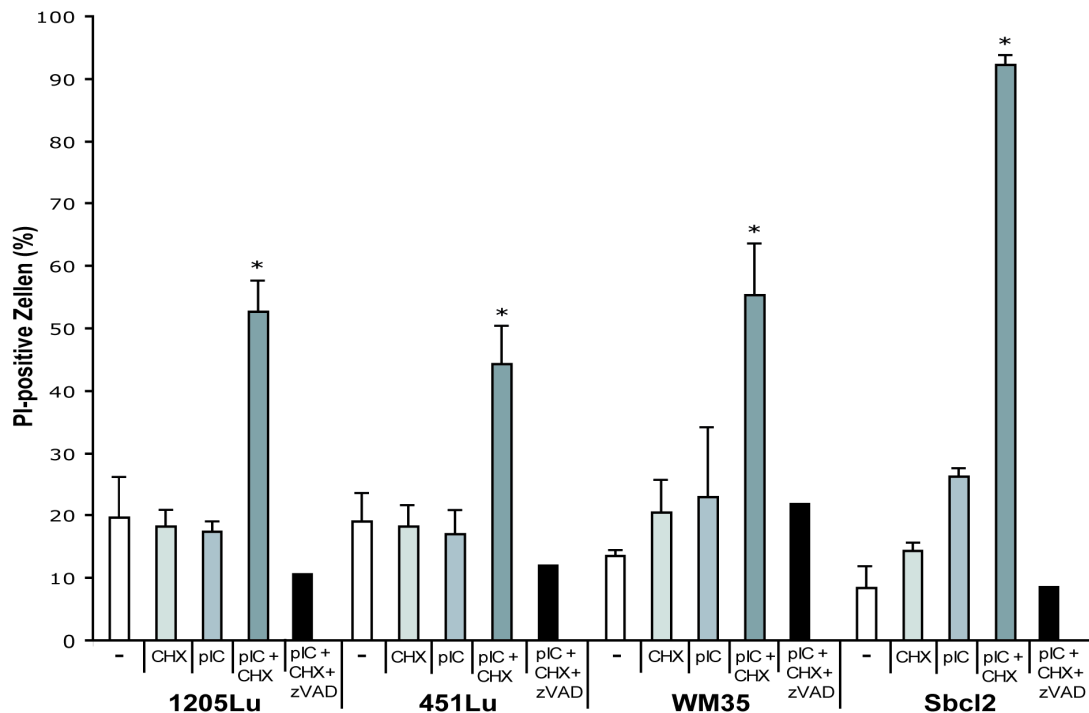
Es konnte bestätigt werden (wie in der Abbildung 15 dargestellt), dass weder Poly I:C noch CHX alleine den apoptotischen Zelltod in den Melanomzellen auslösen können (höchstens knapp über 20 % der PI-positiven Zellen wurden gemessen). Insoweit bei den Poly I:C-stimulierten Zellen gleichzeitig die Proteinbiosynthese durch Verwendung von CHX blockiert wurde, konnte eine synergistische und gleichzeitig signifikante Steigerung des Anteils an PI-positiven Zellen beobachtet werden (bei der Zelllinie Sbcl2 sogar auf über 90 %). Der Poly I:C/CHX-induzierte Zelltod war Caspasen-abhängig, da dieser mit zVAD-fmk blockiert werden konnte.

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Poly I:C/CHX-vermittelte Apoptose in den Melanomzellen tatsächlich über die Stimulierung des TLR3-Rezeptors erfolgt. Der aufgetretene apoptotische Zelltod war nämlich mit Bafilomycin-A, dem Inhibitor der Endosomenreifung in der Zelle, blockierbar (Weber *et al.* 2010).

Da die Versuche mit HaCaTs eine Spaltung von Caspase-8 nach der Stimulation mit Poly I:C gezeigt haben (Weber *et al.* 2010), wurde auch in den Melanomzellen die Bedeutung dieser Protease untersucht. Dazu wurde zuerst die Caspase-8 mittels RNAi herunterreguliert und die Zellen mit der Kombination aus Poly I:C und CHX stimuliert. Nach 24 h wurde die durch



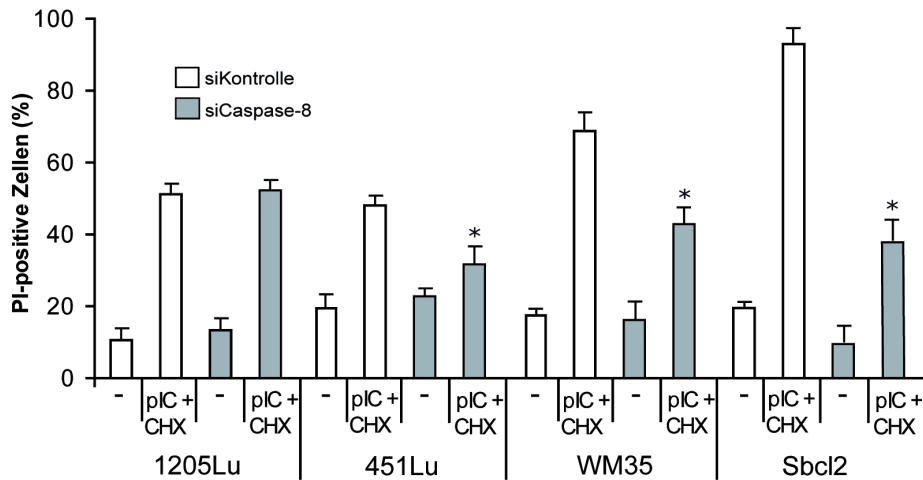
Poly I:C/CHX-induzierte Apoptose ermittelt. Die Effizienz des Knock-downs wurde mittels der Western Blot Analyse überprüft (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 15: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Poly I:C und Cycloheximid.**

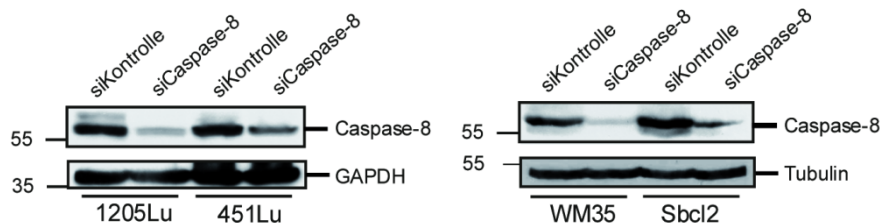
Die Zellen wurden für 24 h mit dem Ethanol als negativ Kontrolle (-), 2,5 µg/ml Cycloheximid (CHX), 50 µg/ml Poly I:C (pIC) bzw. deren Kombination mit oder ohne 50 µM zVAD-fmk (zVAD) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Cycloheximid und zVAD wurden jeweils 2,5 h vor der weiteren Stimulation zugegeben. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten bzw. 2 unabhängigen Experimenten für zVAD-vorstimulierten Zellen. \* P < 0,05 im Vergleich zur Einzelstimulation mit CHX oder Poly I:C.

Die Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten ein ähnliches apoptotisches Muster nach der Stimulation mit Poly I:C und Cycloheximid, wie es bereits in der Abbildung 15 zu sehen war. In den Zellen dagegen, in welchen die Caspase-8 herunterreguliert war, wurde ein signifikant verringerter Anstieg des apoptotischen Zelltodes beobachtet (Abbildung 16). Die einzige Ausnahme hier war die Zelllinie 1205Lu, die zwar eine gute Herunterregulation von Caspase-8 auf der Proteinebene aufwies (Abbildung 17), die durchflusszytometrische Analyse aber keine geringere Apoptose nach der Stimulation mit Poly I:C/CHX bei den siCasp-8-Zellen gezeigt hat.



**Abbildung 16: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch Poly I:C und Cycloheximid nach dem transienten Knock-down von Caspase-8.**

Die Zellen wurden mit der Kontroll-siRNA (siKontrolle) oder siRNA gegen Caspase-8 (siCaspase-8) transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für die nächsten 24 h mit Ethanol (-) oder 50 µg/ml Poly I:C und 2,5 µg/ml CHX stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05 im Vergleich zur Kombinationsstimulation mit CHX und Poly I:C nach der Kontroll-siRNA.



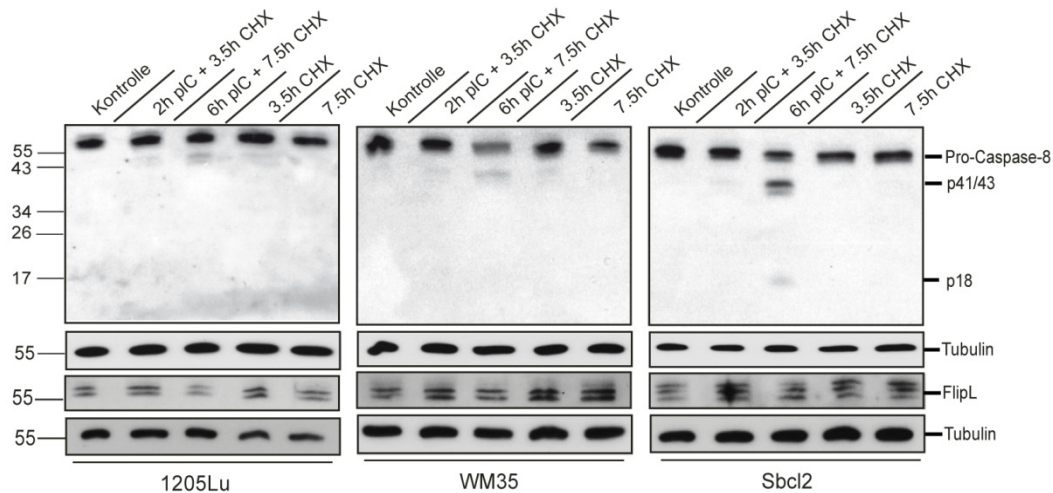
**Abbildung 17: Die Effizienz des Caspase-8 Knock-downs in Melanomzellen mittels siRNA.**

Die Gesamtzellextrakte wurden nach 48-stündiger Transfektion mit der angegebenen siRNA gewonnen, via SDS-PAGE aufgetrennt und Caspase-8 schließlich mittels Western Blot detektiert. Tubulin und GAPDH dienten als Ladekontrolle.

Nachdem die oben beschriebenen Experimente gezeigt haben, dass Caspase-8 eine wichtige Rolle bei der Poly I:C/CHX-induzierten Apoptose spielen könnte, wurde dies auf der Proteinebene untersucht. Dazu wurden drei Melanomzelllinien mit CHX vorstimuliert und dann mit Poly I:C behandelt oder nur mit CHX stimuliert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Gesamtzellextrakte aus den stimulierten Zellen gewonnen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurden die Proben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Caspase-8 sowie ihr Inhibitor FLIP mittels Western Blot visualisiert (Abbildung 18).

Es konnte eine klare Spaltung und somit eine Aktivierung der Caspase-8 nach einer 6-stündigen Poly I:C/CHX-Stimulation und eine weniger erkennbare Spaltung nach einer 2-

stündigen Poly I:C/CHX-Behandlung nachgewiesen werden. Dabei wurden die Spalt-Fragmente mit 41 kDa und 43 kDa Größe sichtbar. Das kleinere Spaltprodukt der Caspase-8 mit 18 kDa war allerdings nur bei der Zelllinie Sbc12 deutlich zu erkennen. Die Behandlung mit CHX alleine hatte keinen Einfluss auf die Spaltung von Caspase-8. Außerdem konnte keine wesentliche Änderung der Proteinmenge des Caspase-8-Inhibitors FLIP nach der Stimulierung mit Poly I:C und CHX festgestellt werden.



**Abbildung 18: Einfluss der Stimulation mit Poly I:C und Cycloheximid auf die Proteinexpression der Caspase-8 und deren Inhibitor FLIP in Melanomzellen.**

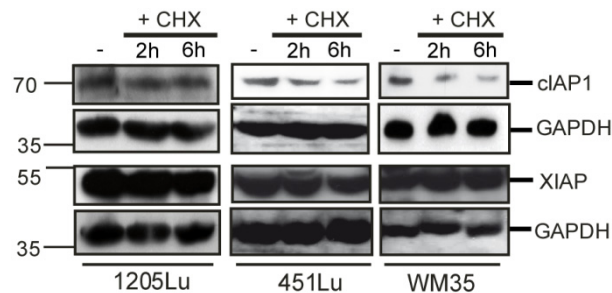
Die Zellen wurden mit Ethanol (Kontrolle) oder 50 µg/ml Poly I:C (pIC) für jeweils 2 h und 6 h stimuliert und 2,5 µg/ml Cycloheximid (CHX) wurde 1,5 h vorher dazugegeben. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und Caspase-8 oder FLIP schließlich mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Wie bereits durch die oben beschriebenen Experimente gezeigt wurde, kann Poly I:C nur dann den apoptotischen Zelltod in den Melanomzellen auslösen, wenn die Proteinbiosynthese blockiert ist. CHX müsste in dem Fall die Translation von einem Molekül (wahrscheinlich einem Inhibitor) verhindern, welches normalerweise die Poly I:C-vermittelte Apoptose in den Melanomzellen blockiert. Die zusätzliche Tatsache, dass die Caspase-8 für die Poly I:C/CHX-induzierte Apoptose von Bedeutung ist, lässt vermuten, dass die Proteine aus der IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*)-Familie hier eine entscheidende Rolle spielen könnten. Es wurde berichtet, dass die Aktivierung des Caspase-8-haltigen Proteinkomplexes nach der Stimulation vom TNFR1 durch die zellulären IAPs (cIAP1 und cIAP2) negativ reguliert werden kann (Wang *et al.* 1998; Petersen *et al.* 2007; Varfolomeev *et al.* 2007; Vince *et al.* 2007). Der Beitrag der IAPs zu der Poly I:C/CHX-induzierten Apoptose wurde demzufolge überprüft.

Drei Melanomzelllinien wurden mit CHX für zwei verschiedene Zeitpunkte stimuliert und die danach gewonnenen Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE auf dem Polyacrylamidgel

aufgetrennt. Dann wurden die Proben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und cIAP1 sowie XIAP mittels Western Blot detektiert (Abbildung 19).

Die Western Blot Analyse hat gezeigt, dass CHX eine klare Reduktion des Proteins cIAP1 in 451Lu und WM35 Zelllinien bewirkt. In den 1205Lu Zellen war die Abnahme des Proteinspiegels von cIAP1 dagegen eher mäßig. In allen drei Zelllinien konnte keine deutliche Änderung der Proteinmenge von XIAP festgestellt werden.



**Abbildung 19: Einfluss der Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid auf die Proteinexpression der IAPs in Melanomzellen.**

Die Zellen wurden mit Ethanol (-) oder 2,5 µg/ml Cycloheximid (CHX) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und cIAP1 oder XIAP schließlich mittels Western Blot detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

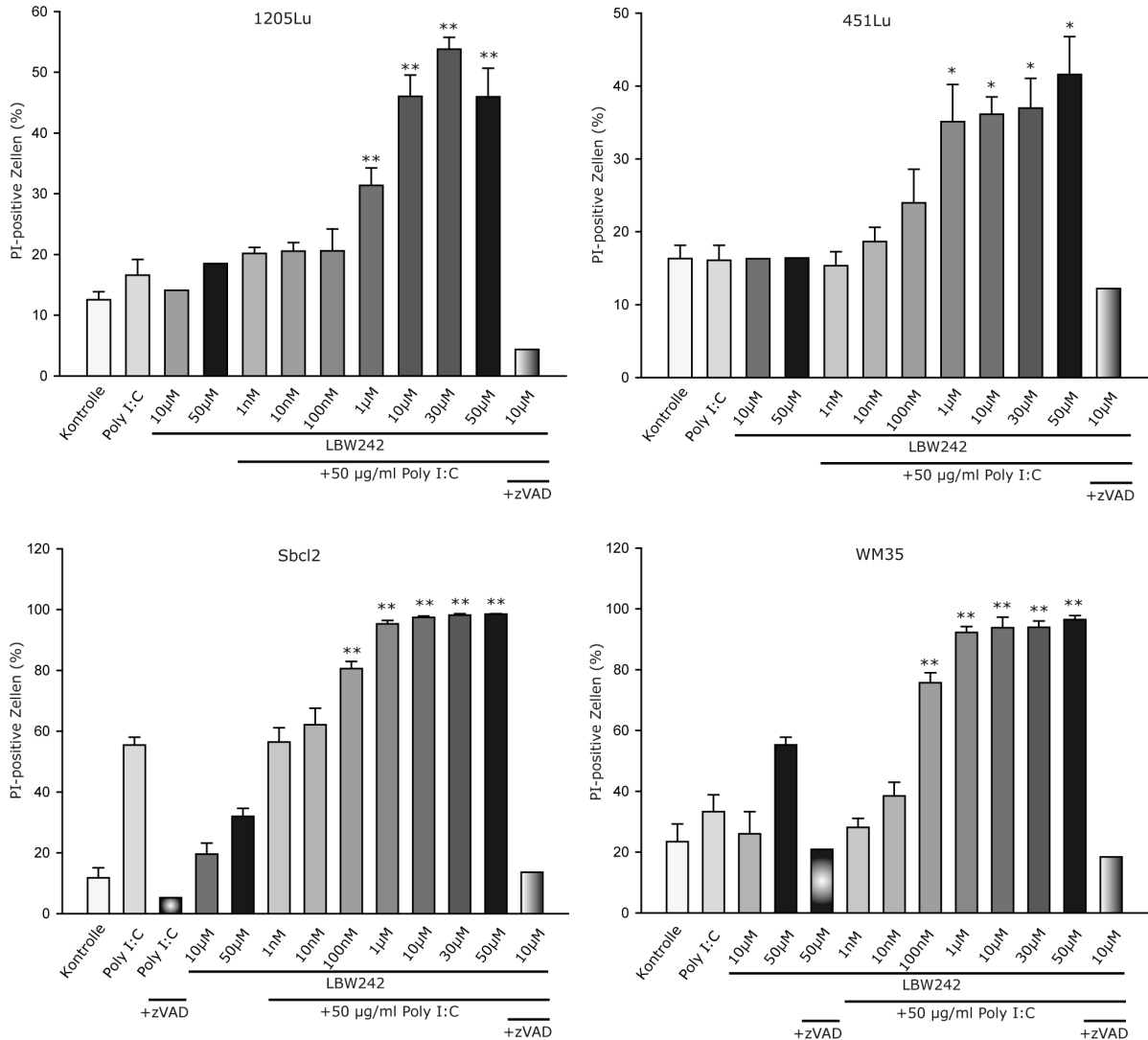
### 3.2.2 Stimulation der Melanomzellen mit der Kombination von Poly I:C und Smac-Mimetikum LBW242

Die IAPs können den apoptotischen Zelltod der Zelle blockieren und sind häufig in den Tumoren überexprimiert (Salvesen und Duckett 2002; Srinivasula und Ashwell 2008). Sie können durch die Verwendung von IAP-Inhibitoren, auch Smac-Mimetika genannt (da sie auf der Fähigkeit des Moleküls Smac/DIABLO, die IAPs zu binden, basieren), blockiert werden. Um die Rolle der IAPs bei der Hemmung der Poly I:C-induzierten Apoptose in den Melanomzellen zu bestätigen, wurde ein Smac-Mimetikum LBW242 verwendet.

Die apoptotische Fähigkeit von LBW242 alleine und in Kombination mit Poly I:C wurde in allen vier Melanomzelllinien untersucht. Die Zellen wurden mit Poly I:C alleine, mit zwei Konzentrationen von LBW242 sowie mit mehreren Konzentrationen von LBW242 in Kombination mit Poly I:C für 72 h stimuliert. Die resultierende Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 20, Zusammenstellung des Experiments mit ausgewählten Konzentrationen in Abbildung 21).

Aus der Einzelstimulation aller Zelllinien mit LBW242 resultierte eine eher mäßige Apoptose. Die einzige Ausnahme war die Zelllinie WM35, welche nach einer Behandlung mit der höchsten LBW242-Konzentration von 50 µM, ca. 55 % der PI-positiven Zellen aufwies. Nach einer 72-stündigen Behandlung mit Poly I:C alleine, konnte man (ähnlich wie bei LBW242)

eine geringe Apoptose von höchstens ca. 30 % beobachten. Eine Ausnahme war auch hier zu sehen: ca. 55 % der Sbc12-Zellen waren nach der Einzelstimulation mit Poly I:C PI-positiv (Abbildung 20 und Abbildung 21).



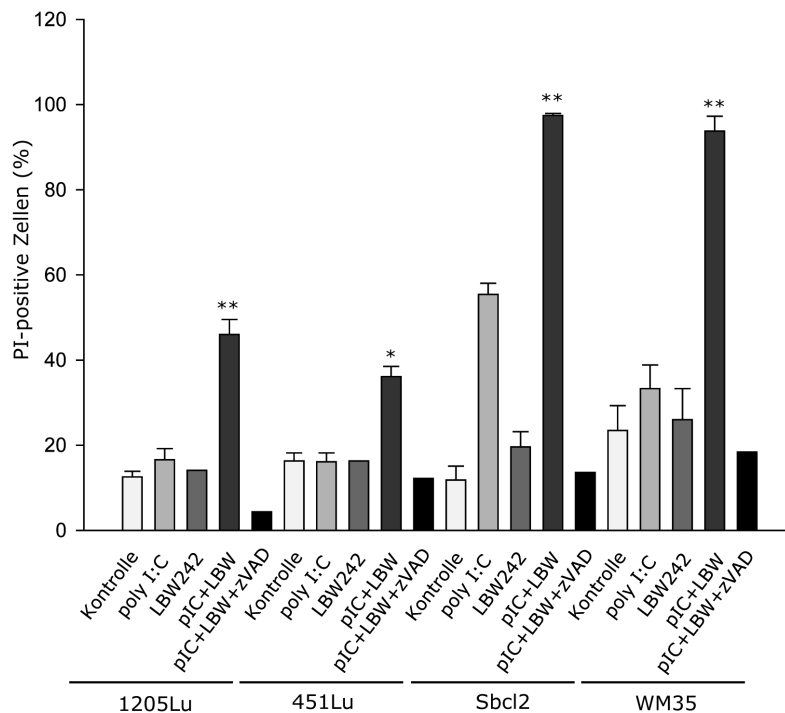
**Abbildung 20: Apoptoseinduktion in Melanomzelllinien durch den kombinierten Einsatz von Poly I:C und LBW242.**

Die Zellen wurden für 72 h mit DMSO (Kontrolle), 50 µg/ml Poly I:C, angegebenen Konzentrationen von LBW242 mit und ohne Poly I:C stimuliert. Zusätzlich wurde bei allen Zelllinien 50 µM zVAD-fmk (zVAD) zu der Kombinationsstimulierung mit 50 µg/ml und 10 µM LBW242 zugegeben. Die Zelllinie Sbc12 wurde zusätzlich bei Poly I:C alleine und die WM35 bei 50 µM LBW mit zVAD-fmk vorbehandelt. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. zVAD wurde mindestens 30 min vor der weiteren Stimulation zugegeben. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Zwei Experimente wurden im Fall von den zVAD-vorstimulierten und LBW242-einzelbehandelten Zellen durchgeführt und ein Experiment bei 1205Lu und 451Lu Zellen mit LBW242 alleine (daher keine Fehlerbalken vorhanden). \* P < 0,03, \*\* P < 0,006 im Vergleich zur Einzelstimulation mit Poly I:C.

Ein synergistischer Anstieg der Apoptose war dagegen in allen Melanomzelllinien nach der Kombinationsbehandlung mit LBW242 und Poly I:C zu sehen. Für die Zelllinien WM35 und

Sbcl2 war sogar bereits ab der LBW242-Konzentration von 100 nM eine signifikante Steigung der apoptotischen Ereignisse nachweisbar. Die höheren Konzentrationen von LBW242 in Kombination mit Poly I:C resultierten bei den Zelllinien WM35 und Sbcl2 in einer sehr hohen Zelltodrate von über 90 % (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21).

Die metastatischen Zelllinien 1205Lu und besonders 451Lu waren viel resistenter gegen die Kombinationsbehandlung mit Poly IC und LBW242. Dennoch war eine signifikante Erhöhung der Apoptose ab der LBW242-Konzentration von 1 mM zu erkennen. Über 40 % der 451Lu-Zellen und über 50 % der 1205Lu-Zellen waren PI-positiv nach der Kombinationsstimulation mit den höchsten LBW242-Konzentrationen (Abbildung 20 und Abbildung 21). Die Stimulationsarten, welche die höchsten Apoptoseraten hervorgerufen haben, waren mit dem Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk blockierbar. Dies weist darauf hin, dass der Zelltod in Abhängigkeit von Caspasen eingetreten ist.

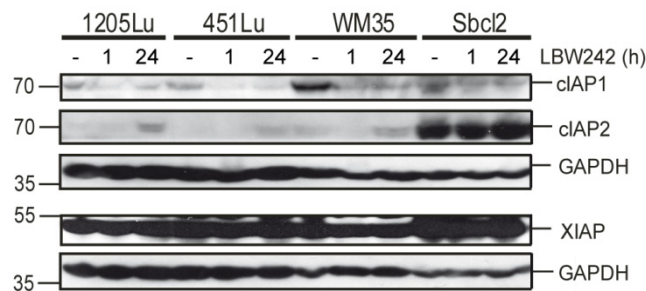


**Abbildung 21: Zusammenstellung der Apoptoseinduktion in Melanomzelllinien durch den kombinierten Einsatz von Poly I:C und LBW242.**

Die Vorgehensweise wurde bereits in der Legende zur Abbildung 20 beschrieben. Die ausgewählten Standardkonzentrationen: 10  $\mu$ M LBW242 und 50  $\mu$ g/ml Poly I:C. \*  $P < 0,03$ , \*\*  $P < 0,006$  im Vergleich zur Einzelstimulation mit Poly I:C.

Wie bereits demonstriert, sensibilisiert das Smac-Mimetikum LBW242 sonst resistente Melanomzellen für die Poly I:C-vermittelte Apoptose. Um die IAP-bedingte Sensibilisierung der Zellen für Poly I:C zu überprüfen, wurde ein Western Blot Experiment angesetzt. Dazu wurden Melanomzellen für verschiedene Zeitpunkte mit LBW242 stimuliert und die Gesamtzellextrakte gewonnen. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und

die IAP-Proteine (cIAP1, cIAP2 und XIAP) schließlich mit Hilfe von der Western Blot Analyse visualisiert (Abbildung 22).

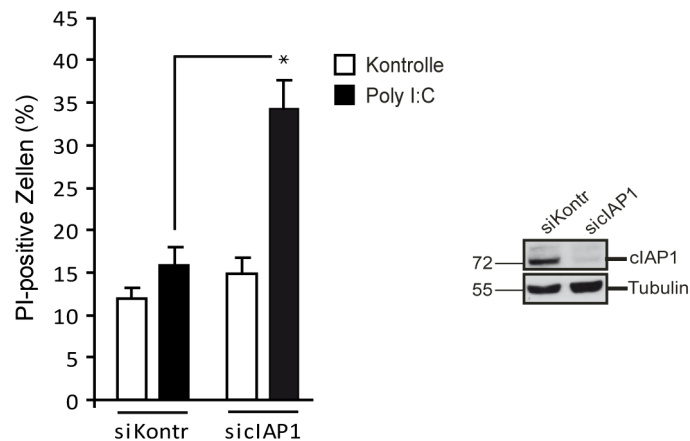


**Abbildung 22: Einfluss der Stimulation mit dem Smac-Mimetikum LBW242 auf die Proteinexpression der IAPs in Melanomzellen.**

Die Zellen wurden mit DMSO (-) oder 10  $\mu$ M LBW242 für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die gewonnene Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und cIAP1, cIAP2 oder XIAP schließlich mittels Western Blot detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse konnten in 2 unabhängigen Versuchen verifiziert werden.

Es wurden zwei Zeitpunkte, ein kürzerer (1 h) und ein längerer (24 h), für alle vier Melanomzelllinien ausgewählt, um den möglichen Abbau der IAPs durch die Verwendung von LBW242 zu verfolgen (Abbildung 22, links). Es konnte bei allen getesteten Zelllinien schon nach einer relativ kurzen Zeit (1 h) das Verschwinden der cIAP1-Bande beobachtet werden. Überraschenderweise sind die Proteinspiegel von cIAP2 bei den Zelllinien 1205Lu und 451Lu nach 24 h gestiegen und bei der Zelllinie WM35 erst gesunken (1 h) und dann wieder gestiegen (24 h). Bei der Zelllinie Sbc12, welche von Anfang an eine relativ hohe cIAP2-Proteinmenge aufwies, hat sich die Intensität der Bande die ganze Zeit über kaum geändert. Alle Melanomzelllinien zeigten eine hohe Expression von XIAP, die auch nach der Behandlung mit LBW242 gleich geblieben ist.

Um die wichtige Rolle von cIAP1 und dessen Abbau durch LBW242 auf der zellulären Ebene zu untersuchen, wurde bei der Zelllinie WM35 das Protein transient herunterreguliert und die Zellen mit Poly I:C behandelt. Dafür waren die Zellen für 24 h der Kontroll- und der cIAP1-siRNA ausgesetzt. Anschließend wurden dann die Zellen für die weiteren 72 h mit Poly I:C stimuliert. In Anwesenheit von cIAP1 (die Effizienz des Knock-downs ist in der Abbildung 23 rechts zu sehen) hat die Behandlung mit Poly I:C im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu keinem Anstieg der Apoptose geführt. Die Senkung des Proteinspiegels von cIAP1 resultierte dagegen in einer signifikanten Erhöhung des apoptotischen Zelltodes nach der Poly I:C-Stimulation (Abbildung 23, links).



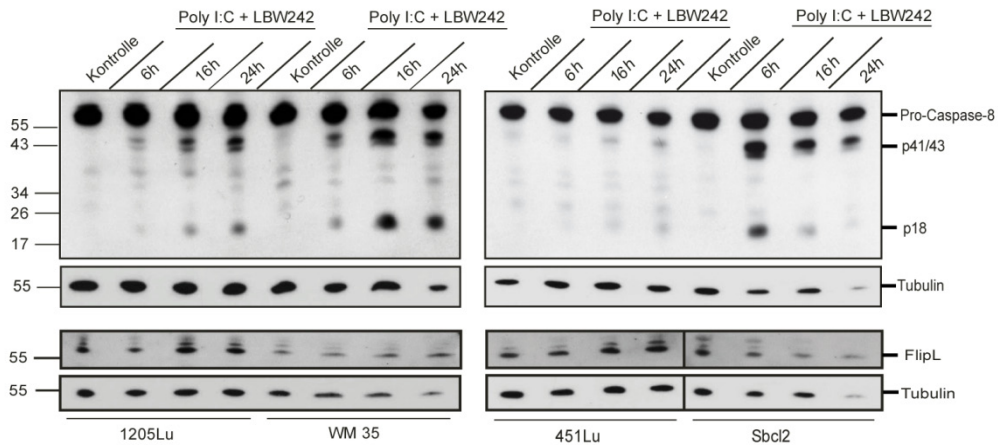
**Abbildung 23: Zunahme der Poly I:C-induzierten Apoptose in WM35 Zellen durch den transienten Knock-down von cIAP1.**

Die Zellen wurden mit der Kontroll-siRNA (siKontr) oder siRNA gegen cIAP1 (siClAP1) transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für die nächsten 72 h mit DMSO (Kontrolle) und 50 µg/ml Poly I:C stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0,02$  im Vergleich zur Stimulation mit Poly I:C nach der Kontroll-siRNA. Die Western Blot Analyse (rechts) zeigt die Effizienz des Knock-downs 48 h nach der Transfektion mit der siRNA. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Wie bereits beobachtet, kann Poly I:C zusammen mit dem Smac-Mimetikum LBW242 Apoptose in Melanomzellen auslösen (Abbildung 20 und Abbildung 21). Die Sensibilisierung der Zellen für Poly I:C durch die Verwendung von LBW242 hängt mit der Fähigkeit des Mimetikums zusammen, das cIAP1 in der Zelle abzubauen (Abbildung 22). Für die Überprüfung, ob diese Apoptose, ähnlich wie bei Poly I:C und CHX, über die Caspase-8 erfolgt, wurden weitere Western Blot Experimente angesetzt. Dafür wurden die Zellen mit der Kombination aus Poly I:C und LBW242 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die danach gewonnenen Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Schließlich wurde die Spaltung von Caspase-8 und gleichzeitig die FLIP-Expression mittels der Western Blot Analyse detektiert (Abbildung 24).

Nach der Kombinationsstimulation mit Poly I:C und LBW242 konnte mit Hilfe von Western Blot eine Spaltung von Caspase-8 in allen Melanomzelllinien nachgewiesen werden. Man konnte nicht nur das Spaltprodukt auf der Höhe von 41/43 kDa, sondern auch das kleinere Spaltfragment bei 18 kDa beobachten. Am deutlichsten konnte die Spaltung der Caspase-8 in den Zelllinien Sbc12 und WM35 nachgewiesen werden, am wenigsten war bei der Zelllinie 451Lu von der Spaltung zu sehen. Das Spaltfragment mit 18 kDa war bereits nach 6 h nur bei der Zelllinie Sbc12 deutlich zu erkennen. Die Spaltung der Caspase-8 war bei der Zelllinie WM35 auch gut zu erkennen, allerdings erst nach 16 h. Eine mäßige und relativ späte (nach 24 h) Spaltung der Caspase-8 konnte dagegen bei der Zelllinie 1205Lu festgestellt werden (Abbildung 24).

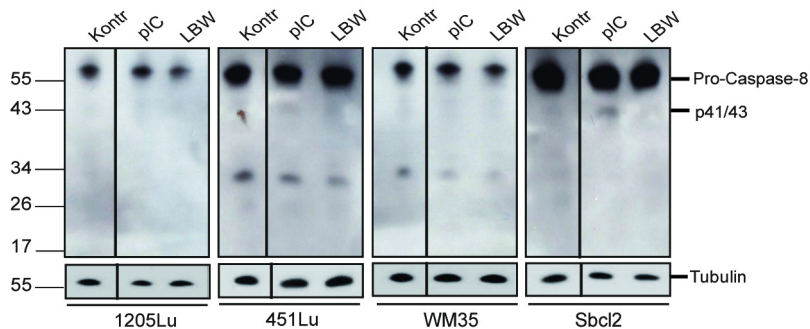




**Abbildung 24: Einfluss der Stimulation mit Poly I:C und LBW242 auf die Spaltung von Caspase-8 und die Expression von FLIP in Melanomzellen.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle) oder 10  $\mu$ M LBW242 und 50  $\mu$ g/ml Poly I:C für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und Caspase-8 oder FLIP<sub>L</sub> schließlich mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse konnten in 2 unabhängigen Versuchen verifiziert werden.

Gleichzeitig wurde auch die Expression von dem Caspase-8-Inhibitor FLIP überprüft. Die bedeutsame Änderung der Proteinmenge von FLIP nach der Poly I:C/LBW242-Stimulation war allerdings nicht zu erkennen. Es war möglicherweise eine leichte Erhöhung der FLIP-Proteinmenge über die Zeit in den Zelllinien 1205Lu und 451Lu zu sehen.



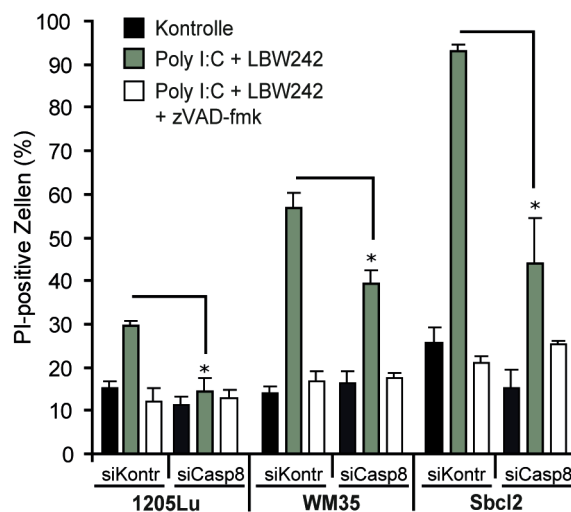
**Abbildung 25: Einfluss der Einzelstimulation mit Poly I:C oder LBW242 auf die Spaltung von Caspase-8 in Melanomzellen.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle) bzw. 10  $\mu$ M LBW242 oder 50  $\mu$ g/ml Poly I:C für 24 h (WM35 und Sbc12) oder 48 h (1205Lu und 451Lu) stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und Caspase-8 schließlich mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als die Ladekontrolle.

Um sicherzustellen, dass die Spaltung der Caspase-8 nur bei der Poly I:C/LBW242-Doppelbehandlung auftritt, wurden die Zellen mit Poly I:C bzw. LBW242 mono-behandelt und die Proben gegen Caspase-8 gefärbt. Dafür wurden die Zellen mit Poly I:C bzw. LBW242 für 24 h und 48 h stimuliert, die Proteinextrakte auf dem SDS-Gel aufgetrennt und die Caspase-8 mit dem geeigneten Antikörper visualisiert (Abbildung 25). Es war tatsächlich keine

Spaltung der Caspase-8 nach den Einzelstimulationen der vier Zelllinien zu sehen. Nach der Stimulation mit Poly I:C konnte nur bei der Zelllinie Sbc12 ein schwaches Signal von dem größeren Spaltprodukt mit 41/43 kDa erkannt werden. Das kleine Spaltfragment mit 18 kDa war in keiner Spur sichtbar (Abbildung 25).

Um die essentielle Bedeutung von Caspase-8 bei der Poly I:C/LBW242-induzierten Apoptose in dem zellulären Milieu zu bestätigen, wurde bei drei Melanomzelllinien mittels siRNA die Caspase-8 transient herunterreguliert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Poly I:C und LBW242 für die weiteren 72 h stimuliert. Die resultierende Apoptose wurde schließlich als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 26).

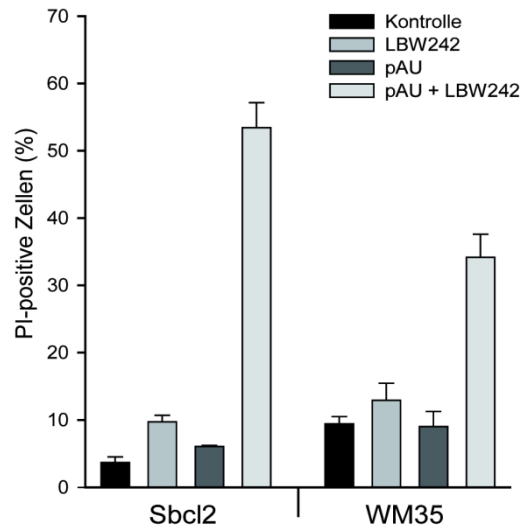


**Abbildung 26: Schutz vor Poly I:C/LBW242-induzierter Apoptose durch den transienten Knock-down von Caspase-8 in Melanomzellen.**

Die Zellen wurden mit der Kontroll-siRNA (siKontr) oder siRNA gegen Caspase-8 (siCasp8) transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für die nächsten 72 h mit DMSO (Kontrolle) oder 50 µg/ml Poly I:C und 10 µM LBW242 stimuliert. 50 µM zVAD-fmk wurde mindestens 30 min vor der Stimulation mit Poly I:C/LBW242 verwendet. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05 im Vergleich zur Kombinationsstimulation mit Poly I:C und LBW242 nach der Transfektion mit der Kontroll-siRNA.

In den getesteten Zelllinien konnte die Poly I:C/LBW242-vermittelte Apoptose in unterschiedlichem Ausmaß gemessen werden. Die mit der Kontroll-siRNA transfizierten 1205Lu-Zellen waren zu ca. 30 %, die WM35 Zellen zu ca. 55 % und die Zelllinie Sbc12 zu über 90% apoptotisch. Die Verringerung der mRNA von Caspase-8 führte in allen Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose nach der Kombinationsbehandlung mit Poly I:C und LBW242 (Abbildung 26).

Die zwei am meisten sensitiven Zelllinien WM35 und Sbc12 wurden zusätzlich mit einem anderen TLR3-Ligand mit und ohne LBW242 stimuliert, um den Signalweg über TLR3 zu bestätigen. Dafür wurden die Zellen mit jeweils Poly A:U und LBW242 alleine und mit der Kombination aus Poly A:U und LBW242 für 72 h stimuliert. Der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von Poly A:U und LBW242.**

Die Zellen wurden für 72 h mit DMSO (Kontrolle), 50 µg/ml Poly A:U, 10 µM LBW242 und der Kombination pAU/LBW242 stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

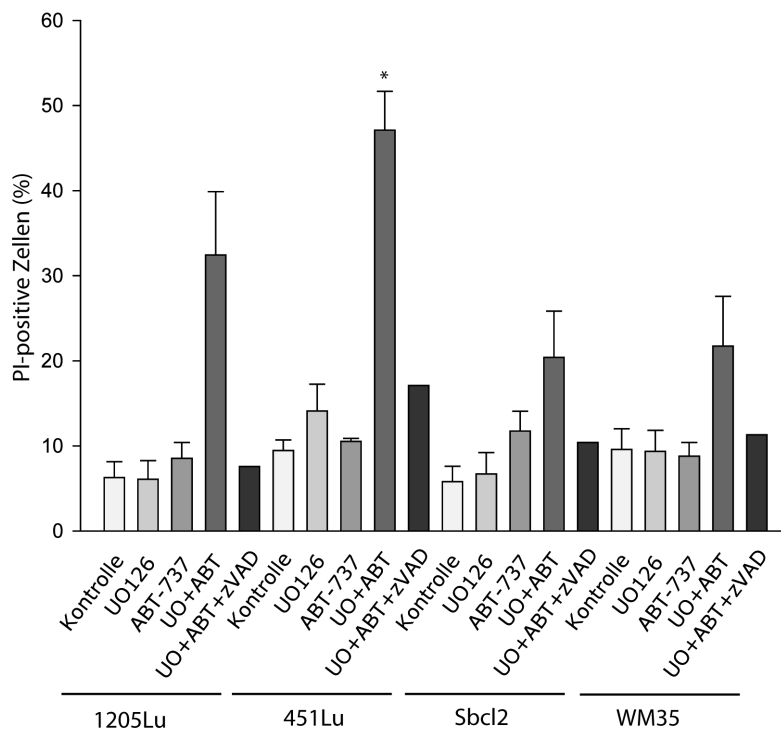
Ähnlich wie bei der Behandlung mit Poly I:C und LBW242 (Abbildung 20 und Abbildung 21) wurden nur wenige apoptotische Zellen (knapp über 10 %) nach der Einzelstimulation mit Poly A:U bzw. LBW242 gemessen. Die Doppelkombination dagegen ergab einen synergistischen Anstieg von PI-positiven Zellen. Man konnte bei der Zelllinie WM35 über 30 % und bei den Sbc12-Zellen sogar über 50 % apoptotische Ereignisse nachweisen (Abbildung 27).

### **3.3 Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz des MEK-Inhibitors UO126 und ABT-737**

Der MAP-Kinasen-Signalweg ist in vielen Melanomzellen überaktiviert. Dies induziert das Überleben der transformierten Zellen. Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die Kinase MEK, was folglich zur fehlenden Phosphorylierung von ihrer Target-Kinase ERK führt. Die ERK-Inhibition kann u. a. die Bim-Akkumulierung und den proteasomalen Abbau von Mcl-1 bedeuten (s. Kapitel 1.1.5.2). Es wurde berichtet, dass die Melanomzelllinien, welche aus

den primären Tumoren gewonnen wurden, dem MEK-Inhibitor UO126 gegenüber sensitiv sind. Für die Auslösung der Apoptose in den aus den Metastasen entwickelten Melanomzelllinien reicht das UO126 alleine dagegen nicht aus (Smalley *et al.* 2006). In einer anderen Studie wurde behauptet, dass der UO126-vermittelte Zelltod von Melanomzellen Caspasen-unabhängig, dafür AIF(*apoptosis-inducing factor*)-abhängig verläuft (Wang *et al.* 2007).

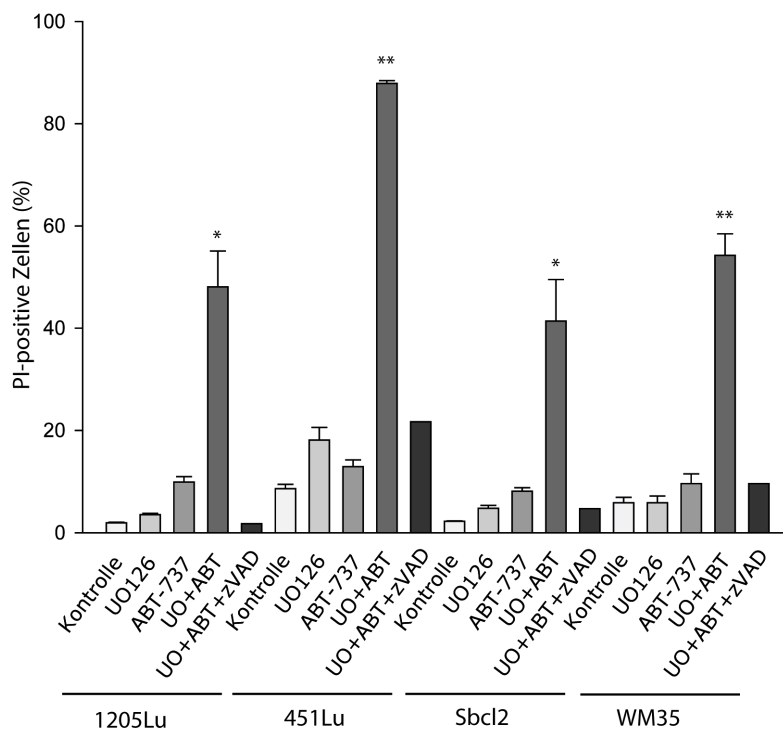
Hier wurde der pro-apoptotische Effekt der MAPK-Inhibition mit UO126 in den Melanomzelllinien untersucht. Zusätzlich wurde die Kombination aus dem MEK-Inhibitor UO126 und dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 getestet. Die Auswirkung der UO126/ABT-737-vermittelten Apoptose in den Melanomzellen auf die Expression der Proteine aus der Bcl-2-Familie, insbesondere Noxa, Mcl-1 und Bim, wurde ebenfalls geprüft. Die Inhibition der Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3) mit CT98014 sowie die Herunterregulation von der Deubiquitinase USP9X sollten den UO126-induzierten Abbau von Mcl-1 aufklären.



**Abbildung 28: Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 mit ABT-737 nach 24 h.**

Die Zellen wurden für 24 h mit DMSO als negativ Kontrolle (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737 oder 10  $\mu$ M UO126 bzw. deren Kombination (UO + ABT) mit oder ohne 50  $\mu$ M zVAD-fmk (zVAD) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. ZVAD wurde Minimum 30 min vor der weiteren Stimulation zugegeben. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten bzw. einem Experiment für zVAD-vorstimulierten Zellen. \* P < 0,05 im Vergleich zur Einzelstimulation mit UO126 und ABT-737.

Wie sich die Inhibition von MEK durch UO126 auf die Melanomzellen auswirkt, wurde in der Abbildung 28 und der Abbildung 29 dargestellt. UO126 wurde alleine sowie zusammen mit dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 auf seine apoptogene Fähigkeiten in vier Melanomzelllinien getestet. Dazu wurden die Zellen mit UO126 und ABT-737 alleine bzw. in der Kombination aus dem MEK-Inhibitor und dem Bcl-2-Antagonist für 24 h (Abbildung 28) und 48 h (Abbildung 29) stimuliert. Die ausgelöste Apoptose wurde durch die PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen und konnte außerdem mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk blockiert werden.



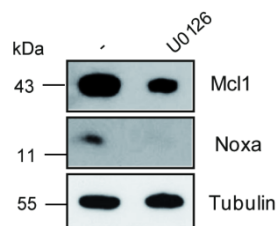
**Abbildung 29: Apoptoseinduktion in Melanomellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 mit ABT-737 nach 48 h.**

Die Zellen wurden für 48 h mit DMSO als negativ Kontrolle (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737 oder 10  $\mu$ M UO126 bzw. deren Kombination (UO + ABT) mit oder ohne 50  $\mu$ M zVAD-fmk (zVAD) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. ZVAD wurde Minimum 30 min vor der weiteren Stimulation zugegeben. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten bzw. einem Experiment für zVAD-vorstimulierten Zellen. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$  im Vergleich zur Einzelstimulation mit UO126 und ABT-737.

Die Behandlungen mit dem Lösungsmittel sowie UO126 und ABT-737 als EinzelAgenzien hat nach 24 h in den Melanomzellen zu einer geringen Apoptoserate von maximal 14 % geführt. Dafür konnte in allen Zelllinien ein synergistischer Anstieg von toten Zellen nach der UO126/ABT-737-Behandlung gemessen werden. In den metastatischen Zelllinien 1205Lu und 451Lu erreichte die Apoptose entsprechend knapp über 30 % und fast 50 %. In den Zelllinien Sbc12 und WM35 waren nach der Kombinationsbehandlung ca. 20 % apoptotische

Zellen nachweisbar. Bei den 451Lu Zellen war der synergistische Anstieg der Apoptose schon nach 24 h auch signifikant (s. Abbildung 28). Nach 48 h dagegen konnte in allen Melanomzelllinien nach der UO126/ABT-737-Behandlung eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen gemessen werden (s. Abbildung 29). Bei den Zelllinien 1205Lu, Sbc12 sowie WM35 bewegte sich die Anzahl der toten Zellen zwischen 40 und fast 55 % und bei den 451Lu-Zellen erreichte sie fast 90 %. Auch nach 48 h, also ähnlich wie bei der 24 h-Behandlung, war die Induktion der Apoptose aller Zelllinien auf die Einzelbehandlung eher moderat. Der durch die Kombinationsbehandlung hervorgerufene Zelltod war in allen Fällen Caspase-abhängig, da der mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk blockierbar war (s. Abbildung 28 und Abbildung 29).

Wie die Daten in der Abbildung 28 und der Abbildung 29 zeigen, reicht die Hemmung des MEK/ERK-Signaltransduktionsweges nicht aus, um in den Melanomzellen eine Apoptose auszulösen. UO126 kann dennoch, wenn es zusammen mit ABT-737 eingesetzt wird, Apoptose erfolgreich initiieren. Nachdem ABT-737 Mcl-1 nicht binden und somit neutralisieren kann (Oltersdorf *et al.* 2005), wurde vermutet, dass UO126 die Mcl-1-Neutralisation eventuell übernehmen kann. Deshalb wurden die WM35-Zellen mit UO126 alleine und mit der UO126/ABT-737-Kombination stimuliert. Die nach der Behandlung gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden zuerst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann mit Hilfe von Western Blot auf die Anwesenheit der Proteine Mcl-1 und Noxa überprüft (s. Abbildung 30). Es konnte tatsächlich bestätigt werden, dass UO126 den Proteinspiegel von Mcl-1 herunterreguliert. Zusätzlich wurde auch die Proteinmenge von Noxa durch die Stimulierung mit dem MEK-Inhibitor verringert, wie in der Abbildung 30 dargestellt.

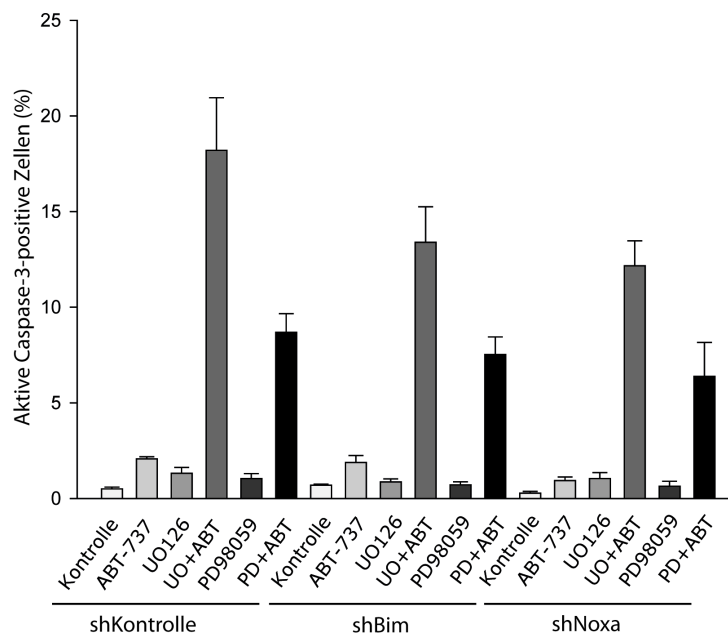


**Abbildung 30: Einfluss der Stimulation mit UO126 auf die Proteinexpression von Mcl-1 und Noxa in WM35 Melanomzellen.**

Die Zellen wurden für 6 h mit 10  $\mu$ M UO126 bzw. dem Lösungsmittel DMSO (-) stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine Mcl-1 und Noxa mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

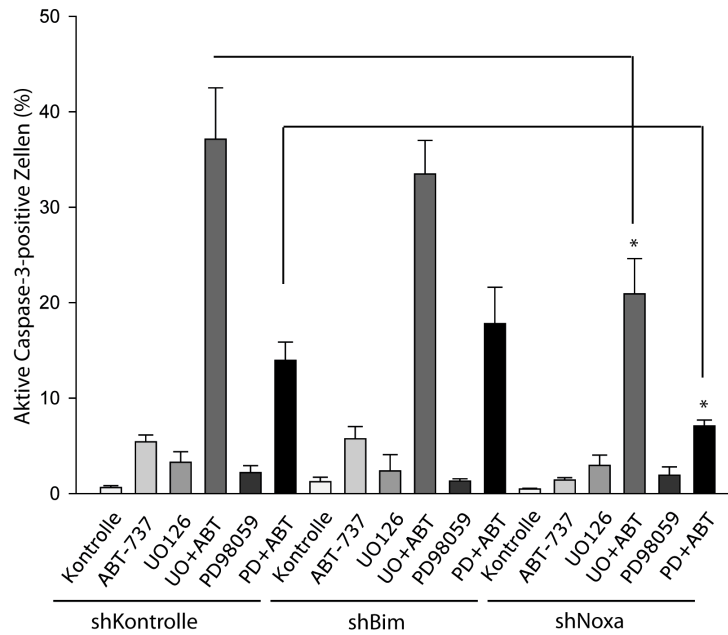
Die Hemmung des MEK/ERK-Signaltransduktionsweges durch UO126 kann die Proteinspiegel von Bim und Mcl-1 beeinflussen (s. Kapitel 1.1.5.2 und Abbildung 30). Außerdem wurde, nachdem Noxa unter Umständen an der Regulation vom Mcl-1 beteiligt sein kann (s. Kapitel 1.1.3.3) und eine Verbindung zwischen UO126 und dem Proteinspiegel von Noxa in der Abbildung 30 nachgewiesen wurde, die Wichtigkeit von Bim oder Noxa auf

dem Zellniveau geprüft. Dazu wurden die bereits im Kapitel 3.1.2 beschriebenen stabilen Knock-down(KD)-Zelllinien, welche die herunterregulierten mRNA-Spiegels von Bim und Noxa aufweisen, verwendet. Die KD-Zellen wurden mit UO126, einem anderen MEK-Inhibitor PD98059 alleine sowie in Kombination mit ABT-737 für 6 h stimuliert. Die ausgelöste Apoptose wurde durch die Färbung von Caspase-3-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Wie in der Abbildung 31 zu sehen ist, hat die Lösungsmittel- und Einzelstimulation der Zelllinien, wie erwartet, nur zu einer geringen Apoptoserate geführt. Darüber hinaus haben die beiden Kombinationsbehandlungen einen lediglich geringen Anstieg der toten Zellen verursacht. Allerdings hat die Kombination von UO126 und ABT-737 im Allgemeinen eine höhere Anzahl von apoptotischen Zellen hervorgerufen (12-18 %) als die gleichzeitige Behandlung mit PD98059 und ABT-737 (6-8 %). Man konnte außerdem eine Tendenz beobachten, dass die shBim- und shNoxa-Zellen etwas resistenter auf die Kombinationsstimulationen im Vergleich zu den Kontrollzellen sind. Nichtsdestotrotz war der Schutz vor der MEK-Inhibitor/ABT-737-induzierten Apoptose durch den Knock-down von Bim und Noxa eher unwesentlich (von 18 % auf 12 bzw. 13 % bei UO126/ABT-737 und von 8 % auf 6 bzw. 7 % bei PD98059/ABT-737).



**Abbildung 31: Apoptoseinduktion in 1205Lu Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 bzw. PD98059 mit ABT-737 nach 6 h.**

Die Zellen wurden für 6 h mit DMSO als negativ Kontrolle (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737, 10  $\mu$ M UO126 und 25  $\mu$ M PD98059 bzw. deren Kombinationen (UO + ABT bzw. PD + ABT) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der Zellen mit der aktiven Form der Caspase-3 im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 32: Apoptoseinduktion in Knock-down Melanomzellen durch den kombinierten Einsatz von UO126 bzw. PD98059 mit ABT-737 nach 16 h.**

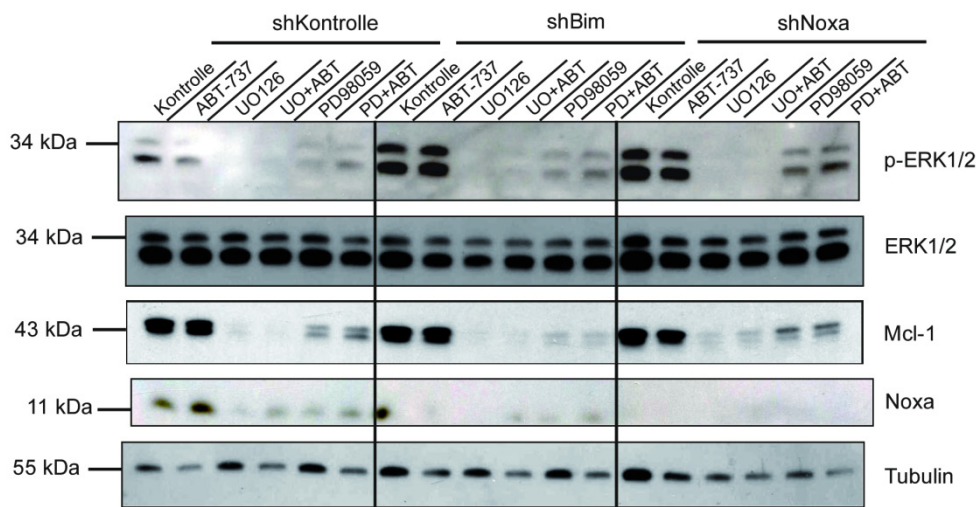
Die Zellen wurden für 16 h mit DMSO als negativ Kontrolle (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737, 10  $\mu$ M UO126 und 25  $\mu$ M PD98059 bzw. deren Kombinationen (UO + ABT bzw. PD + ABT) stimuliert. Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der Zellen mit der aktiven Form der Caspase-3 im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0,05$  im Vergleich zur gleichen Stimulation der Kontrollzellen.

Aus diesem Grund wurde das gleiche Experiment nach einer längeren Stimulationszeit von 16 h durchgeführt. Wie die Abbildung 32 zeigt, ist nach 16 h im Allgemeinen eine erhöhte Anzahl an Caspase-3-positiven Zellen im Vergleich zum 6 h-Zeitpunkt zu beobachten. In dem Fall konnte der synergistische Anstieg der Apoptose nach der Stimulation mit MEK-Inhibitoren und ABT-737 in den Kontrollzellen durch die Herunterregulation von Noxa zum Teil gehemmt werden. Der Bim-Knock-down hat keinen signifikanten Schutz vor der UO126/ABT-Behandlung gezeigt und verursachte sogar eine Erhöhung der Apoptose nach der PD98059/ABT-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Um den Schutz vor der Kombinationsstimulation in Abwesenheit von Noxa auf dem Proteinniveau zu beobachten, wurden die KD-Zellen auf der gleichen Weise wie in der Abbildung 31 und der Abbildung 32 stimuliert. Die nach 16 h gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Wie in der Abbildung 33 dargestellt, wurden die Expressionsspiegel von ERK1/2, Noxa und Mcl-1 sowie die Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht (für den Bim-Western Blot in den 1205Lu-KD-Zellen nach der UO126-Stimulation s. Abbildung 41). Wie erwartet war die Phosphorylierung von ERK1/2 nach der Stimulation mit den MEK-Inhibitoren reduziert und in allen drei Zelllinien gleich ausgeprägt. Die Reduktion der Phosphoform der Kinasen (p-ERK1/2) war im Fall von UO126 stärker als nach der Behandlung mit PD98059



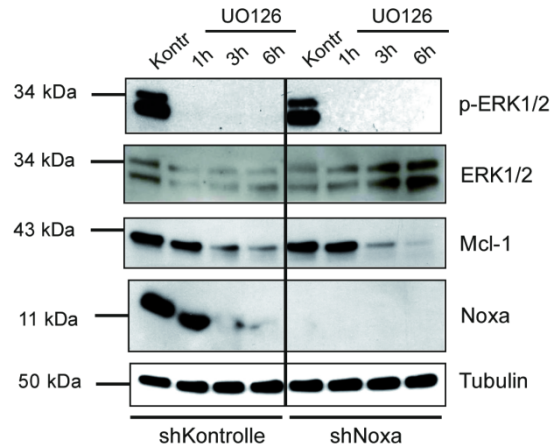
und nahezu vollständig. Diese Herunterregulation von p-ERK1/2 war direkt proportional zu der Abnahme des Proteinspiegels von Mcl-1 in allen Zelllinien. Somit war offenbar die Degradation von Mcl-1 Bim sowie Noxa unabhängig, nachdem es annähernd gleichermaßen in den Kontroll- sowie den KD-Zellen zu sehen war. Gleichzeitig konnte die Abnahme des Proteinspiegels von Noxa nach der MEK-Inhibitor-Stimulation in den Kontrollzellen und den shBim-Zellen beobachtet werden. Der Einfluss von ABT-737 auf die Expression bzw. Phosphorylierung der untersuchten Proteine war eher marginal. Eventuell war der Noxa-Proteinspiegel nach der MEK-Inhibitor/ABT-737-Behandlung etwas höher als nach der Stimulation mit den MEK-Inhibitoren alleine.



**Abbildung 33: Einfluss der Stimulation der KD-Melanomzellen mit UO126, PD98059 und ABT-737 auf die Expression von Mcl-1 und Noxa sowie Phosphorylierung von ERK.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737, 10  $\mu$ M UO126 und 25  $\mu$ M PD98059 oder deren Kombinationen (UO + ABT bzw. PD + ABT) für 16 h stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Alle Banden sind auf demselben Gel gelaufen; die Trennlinie dient nur zur besseren Orientierung. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Membran aus zwei durchgeführten Experimenten.

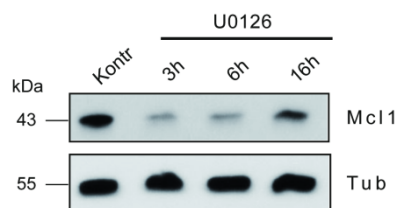
Interessanterweise erfolgte der UO126-vermittelte Mcl-1-Abbau unabhängig von Noxa. Um diese Tatsache genauer zu untersuchen, wurden die Kontrollzellen und Noxa-KD-Zellen unterschiedlich lang mit UO126 stimuliert (s. Abbildung 34). Die zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine mit Hilfe von Western Blot untersucht. Bereits nach 1 h war ERK1/2 in Anwesenheit von UO126 in beiden Zelllinien vollständig dephosphoryliert. 3 h nach der Stimulation war auch die Mcl-1-Degradation zu beobachten. Die Herunterregulation von Noxa erfolgte in den Kontrollzellen ebenfalls nach 3 h also zeitgleich mit Mcl-1.



**Abbildung 34: Einfluss der Stimulation der Kontrollzellen und shNoxa-Zellen mit UO126 auf die Expression von Mcl-1 und Noxa sowie Phosphorylierung von ERK.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontr) bzw. 10  $\mu$ M UO126 für 1 h, 3 h und 6 h stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Alle Banden sind auf demselben Gel gelaufen; die Trennlinie dient nur zur besseren Orientierung.

Um den Abbau von Mcl-1 über eine längere Zeit zu verfolgen wurden die Kontrollzellen zusätzlich für 16 h mit UO126 stimuliert (genauso lang wie bei der durchflusszytometrischen Untersuchung, die in der Abbildung 32 dargestellt ist). Die entstandenen Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot auf die Mcl-1-Proteinspiegel analysiert. Es wurde festgestellt, dass der nach 3 und 6 h erkennbare Mcl-1-Abbau nach 16 h gehemmt wird, und dabei steigt die Mcl-1-Expression wieder an.



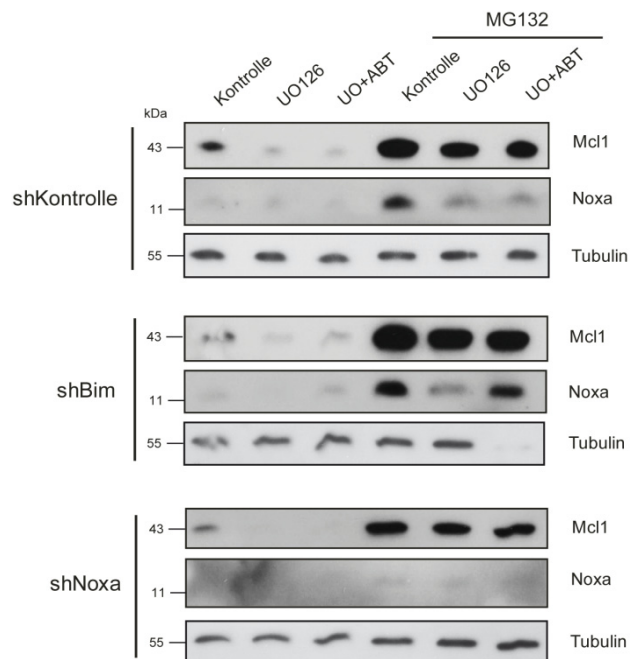
**Abbildung 35: Einfluss der Stimulation der Kontrollzellen mit UO126 auf den Mcl-1-Abbau im Zeitablauf.**

Die Kontrollzellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10  $\mu$ M UO126 bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO (Kontr) stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und das Mcl-1 mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Nachdem die Degradation von Mcl-1 oft durch den proteasomalen Abbau erfolgt (Nijhawan *et al.* 2003; Zhong *et al.* 2005), wurde dieser Zusammenhang untersucht. Wie in der Abbildung 36 dargestellt ist, wurden dazu die Kontroll- sowie KD-Zellen mit UO126 bzw. UO126/ABT-737 behandelt und zusätzlich zum Teil mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 vorstimuliert. In allen getesteten Zelllinien konnte der UO126-vermittelte Mcl-1-Abbau durch das MG132 verhindert werden. Das Western-Blot-Signal von Noxa war in diesem

Experiment ohne MG132 kaum zu erkennen und erst nach der Vorbehandlung mit dem Proteasom-Inhibitor sichtbar geworden (ausgenommen in den shNoxa-Zellen).

Nachdem die UO126-initiierte Degradation von Mcl-1 in den Melanomzellen über das Proteasom erfolgt, stellte sich die Frage wie dieser MEK-Inhibitor den Mcl-1-Abbau auslöst. Es wurde beschrieben, dass die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) durch die Phosphorylierung von Mcl-1 (und folglich dessen Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau) die Apoptose in den IL-3-abhängigen Zellen auslösen kann. In diesem Fall kann die Aufrechterhaltung des Mcl-1-Proteinspiegels und somit die Hemmung des apoptotischen Zelltodes durch die Blockierung von GSK3 erfolgen (Maurer *et al.* 2006).



**Abbildung 36: Die Proteinspiegel von Mcl-1 und Noxa nach der Hemmung des Proteasoms mit MG132 in den Knock-down Melanomzellen vor der Stimulation mit UO126 alleine und UO126 mit ABT-737.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle) bzw. 10 μM UO126 mit und ohne 1 μM ABT-737 (UO + ABT bzw. UO) für 3,5 h stimuliert. Die Blockierung des Proteasoms mit 40 μM MG132 erfolgte 30 min vor der Zugabe von UO126 bzw. UO126/ABT-737. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Demzufolge wurde untersucht, ob sich die UO126/ABT-737-vermittelte Apoptose auch in diesem Fall durch die Inhibierung von GSK3 aufhalten lässt. Die vier Melanomzelllinien 1205Lu, 451Lu, Sbc12 sowie WM35 wurden dazu mit UO126/ABT-737 für 24 h behandelt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit dem GSK3-Inhibitor CT98014 für 16 h vorstimuliert. Wie in der Abbildung 37 gezeigt, wurden die apoptotischen Zellen durch die Färbung von der aktiven Caspase-3 bestimmt und dann mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Die Stimulation mit dem Lösungsmittel, dem MEK-Inhibitor UO126 und dem GSK3-Inhibitor CT98014 sowie mit der Kombination UO126/CT98014 führte in allen Zelllinien zu einer sehr

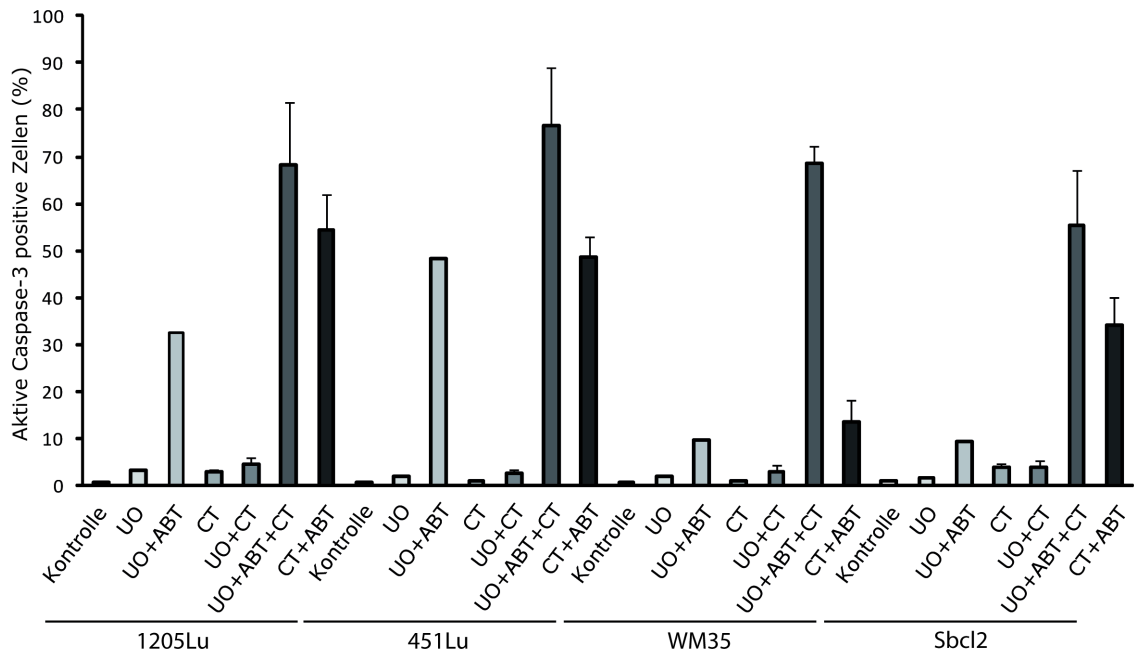
geringen Apoptose von höchstens 5 %. Für 1205Lu- und 451Lu-Zellen konnte nach 24 h eine Zelltodrate von knapp über 30 % und fast 50 % gemessen werden. Die Zelllinien WM35 und Sbc12 wiesen nur eine kleine Caspase-3-positive Zellpopulation (von knapp 10 %) nach der Stimulation mit UO126/ABT-737 auf. Überraschenderweise potenzierte die CT98014-Vorstimulation den UO126/ABT-737-vermittelten apoptotischen Zelltod anstelle diesen zu inhibieren. In den Zelllinien 1205Lu und 451Lu ist die Apoptose nach der CT98014-Vorstimulation um über 35 % bzw. fast 30 % gestiegen im Vergleich zu der Kombinationsbehandlung mit UO126/ABT-737. In den Zelllinien WM35 und Sbc12, welche in viel kleinerem Ausmaß auf die UO126/ABT-737-Stimulation reagiert haben, war der Anstieg der Caspase-3-positiven Population noch stärker. Es konnte eine Zunahme der Apoptose von fast 60 % bei den WM35-Zellen bzw. von knapp über 45 % bei den Sbc12-Zellen gemessen werden. Somit wurde bei keiner der untersuchten Zelllinien durch die Vorstimulation mit dem GSK3-Inhibitor CT98014 ein Schutz vor der UO126/ABT-737-initiierten Apoptose nachgewiesen. Darüber hinaus hat bereits die Kombination aus CT98014 und ABT-737 bei drei Zelllinien eine ziemlich hohe Zelltodrate hervorgerufen. Nach der CT98014/ABT-737-Behandlung starben die metastatischen Zelllinien 1205Lu und 451Lu zu ca. 50 % und die Sbc12-Zellen zu fast 35 %. Die WM35-Zellen waren der CT98014/ABT-737-Stimulation gegenüber jedoch ziemlich resistent, sodass eine geringe Apoptose von ca. 13 % festzustellen war.

Der Einfluss der möglichen Kombinationen aus UO126, ABT-737 sowie CT98014 auf die Melanomzellen wurde am Beispiel der 1205Lu-Zelllinie zusätzlich auf der Proteinebene angeschaut. Dazu wurden die 1205Lu-Zellen mit Lösungsmittel, UO126 und UO126/ABT-737 zum Teil mit der 16-stündigen CT98014-Vorbehandlung (wie in der Abbildung 38 dargestellt ist) für 6 h stimuliert. Die nach der Stimulation gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit der Proteine Mcl-1, Bim<sub>EL</sub> und Noxa getestet.

Wie im Fall von den KD-Zellen (Abbildung 33 bis Abbildung 36), ist auch in den 1205Lu-Zellen durch die Wirkung von UO126 der Mcl-1- und Noxa-Proteinspiegel gesunken. Auch hat die zusätzliche Anwesenheit von ABT-737 diese Reduzierung nicht verändert. Außerdem, wie erwartet, stieg durch die Inhibition von MEK mit UO126 der Bim-Proteinspiegel. CT98014 hat dagegen die Expressionsspiegel von Mcl-1 und Noxa erhöht, welche in der zusätzlichen Anwesenheit von UO126 bzw. UO126 und ABT-737 zum Teil wieder zurückgegangen sind. Auf den Proteinspiegel von Bim hat CT98014 jedoch keinen Einfluss (s. Abbildung 38).

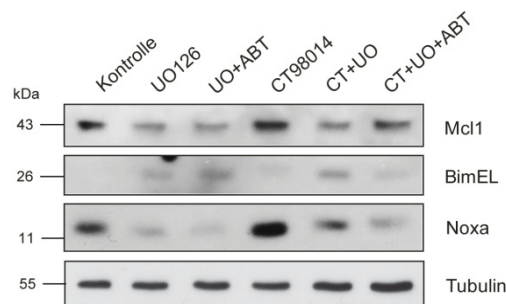
Um die Änderungen in der Proteinexpression von Mcl-1 und Noxa nach der CT98014-Stimulation zu verfolgen, wurden folgende Kinetik-Experimente angesetzt. Die 1205Lu-Zellen

wurden für verschiedene Zeiten mit CT98014 stimuliert und die erhaltenen Gesamtzellextrakte auf den Mcl-1- und Noxa-Proteingehalt mittels Western Blot überprüft.



**Abbildung 37: Die Apoptose der WT Melanomzellen induziert durch die Stimulation mit UO126, ABT-737 und CT98014.**

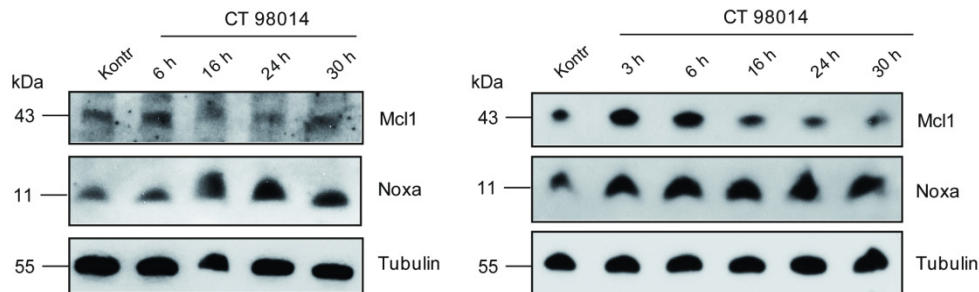
Die Zellen wurden teilweise zuerst für 16 h mit 0,75  $\mu$ M CT98014 (CT) vorstimuliert und dann mit 1  $\mu$ M ABT-737 (ABT) und 10  $\mu$ M UO126 (UO) bzw. deren Kombination für weitere 24 h stimuliert. Die Behandlung mit DMSO diente als Negativkontrolle (Kontrolle). Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der Zellen mit der aktiven Form der Caspase-3 im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Stimulation mit UO126 und ABT-737 (UO + ABT) zeigt ein Mittelwert aus zwei Experimenten.



**Abbildung 38: Einfluss der Stimulation mit UO126, ABT-737 und CT98014 auf die Expression der Proteine aus der Bcl-2-Familie.**

Die 1205Lu Melanomzellen wurden teilweise zuerst für 16 h mit 0,75  $\mu$ M CT98014 (CT) vorstimuliert und dann mit 1  $\mu$ M ABT-737 (ABT) und 10  $\mu$ M UO126 (UO) bzw. deren Kombination für weitere 6 h stimuliert. Die Behandlung mit DMSO diente als Negativkontrolle (Kontrolle). Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Membran aus zwei durchgeführten Experimenten.

Wie in der Abbildung 39 dargestellt, konnte eine rasche Erhöhung (schon nach 3 h bzw. 6 h) des Proteinspiegels von Mcl-1 beobachtet werden. Nach 16 h konnte allerdings eine Abnahme des Mcl-1-Proteinniveaus beobachtet werden. Gleichzeitig wurde eine Zunahme des Proteinspiegels von Noxa nachgewiesen (links im Bild deutlicher zu sehen).



**Abbildung 39: Einfluss der Stimulation mit CT98014 auf die Expression von Mcl-1 und Noxa im Zeitablauf.**

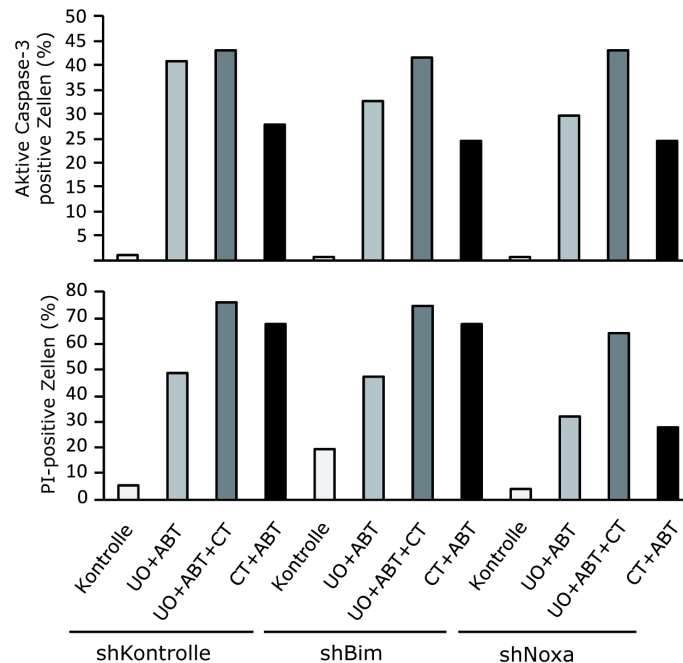
Die 1205Lu Melanomzellen wurden für angegebene Zeiten mit 0,75  $\mu$ M CT98014 stimuliert. Die Behandlung der Zellen mit DMSO diente als Negativkontrolle (Kontr). Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden Western Blot Membranen aus zwei verschiedenen Experimenten dargestellt.

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Abwesenheit von Bim oder Noxa einen Einfluss auf die UO126/ABT-737/CT98014-vermittelte Apoptose haben könnte. Dafür wurden die Kontroll- sowie shNoxa- und shBim-Zellen teilweise 16 h mit CT98014 vorstimuliert und dann mit UO126, UO126/ABT-737 oder ABT-737, wie in der Abbildung 40 dargestellt, für 24 h behandelt. Die hervorgerufene Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen, indem der Anteil der Caspase-3- (oben im Bild) bzw. PI-positiven Zellen (unten im Bild) bestimmt wurde.

Die Messung der aktiven Caspase-3 (oben im Bild) ergab, dass die shBim- und shNoxa-Zellen eine leichte Reduktion der Apoptose (von über 40 % auf ca. 30 %) nach der UO126/ABT-737-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen aufweisen. Wie bereits für die WT-Zellen beobachtet (Abbildung 37), wurde auch im Fall der KD-Zellen die Apoptoserate nach der Vorstimulation mit CT98014 erhöht. Bei den Kontrollzellen machte diese Zunahme nur 2 % aus, bei den shBim- und shNoxa-Zellen war sie etwas höher und betrug 9 % bzw. 14 %. Die Behandlung mit CT98014 und ABT-737 führte ebenso zu einer mäßigen Apoptose und lag für alle Zelllinien mit ca. 25 % ungefähr gleich.

Der Anteil der PI-positiven Zellen (Abbildung 40, unten im Bild) lag im Allgemeinen für fast alle Stimulationsweisen höher als der Anteil der Caspase-3-positiven Zellen (Abbildung 40, oben im Bild). Die durch UO126/ABT-737-hervorgerufene Apoptose betrug für die Kontroll- und shBim-Zellen fast 50 % und für shNoxa-Zellen knapp über 30 %. Durch die Vorstimulation mit CT98014 erhöhte sich der UO126/ABT-737-vermittelte apoptotische

Zelltod und machte für die Kontroll- und shBim-Zellen ca. 75 % und für die shNoxa ca. 65 % der Gesamtpopulation aus. Die Behandlung mit CT98014 und ABT-737 führte zur relativ hohen Apoptoserate von fast 70 % für die Kontroll- und shBim-Zellen und nur knapp 30 % für die shNoxa-Zellen.



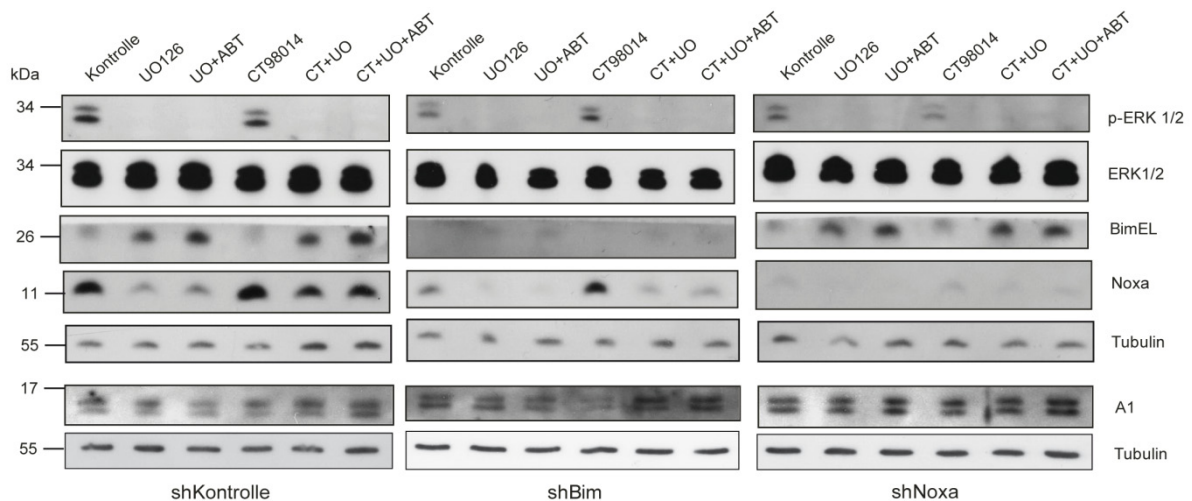
**Abbildung 40: Der apoptotische Zelltod der Knock-down Melanomzellen induziert durch die Stimulation mit UO126, ABT-737 und CT98014.**

Die Zellen wurden teilweise zuerst für 16 h mit 0,75  $\mu$ M CT98014 (CT) vorstimuliert und dann mit 1  $\mu$ M ABT-737 (ABT) und 10  $\mu$ M UO126 (UO) bzw. deren Kombination für weitere 24 h stimuliert. Die Behandlung mit DMSO diente als Negativkontrolle (Kontrolle). Die induzierte Apoptose wurde als der prozentuale Anteil der Zellen mit der aktiven Form der Caspase-3 (oben im Bild) oder als Anteil der PI-positiven Zellen (unten im Bild) im Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen die Werte aus einem Experiment.

Die Testung der Proteinexpression und -phosphorylierung nach der UO126/ABT-737/CT98014-Behandlung ist in der Abbildung 41 dargestellt. Die KD-Melanomzelllinien wurden dafür mit UO126, ABT-737 und CT98014, wie für die Abbildung 41 bereits beschrieben, stimuliert und die danach gewonnenen Gesamtzellextrakte mittels Western Blot auf die Anwesenheit bzw. Phosphorylierung der erwähnten Proteine überprüft.

In allen mit UO126 stimulierten Proben konnte eine eindeutige Dephosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Die Inhibition von MEK hat außerdem eine Akkumulation des Proteins Bim<sub>EL</sub> bewirkt. Dies konnte deutlich in den Kontroll- sowie shNoxa-Zellen und wie erwartet nur sehr schwach in den shBim-Zellen beobachtet werden. Die Abnahme des Proteinspiegels von Noxa konnte wieder als Folge der MEK-Hemmung vor allem in den Kontroll- sowie shBim-Zellen festgestellt werden. Die Stimulation mit CT98014 bewirkte dagegen eine leichte Erhöhung des Noxa-Proteinniveaus, was vor allem in den shBim-Zellen

deutlich zu sehen war. Der Proteinspiegel von Bim<sub>EL</sub> hat sich in keiner der Zelllinien durch die Behandlung mit CT98014 im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle verändert. Der Bim<sub>EL</sub>-Proteinspiegel wurde durch die zusätzliche Anwesenheit von CT98014 nicht beeinflusst, sondern wurde nur durch die UO126-Wirkung bestimmt. Die Noxa-Proteinniveaus wurden dagegen im Allgemeinen in diesen Proben höher, in denen CT98014 zusätzlich an der Stimulation beteiligt war. UO126 wirkte dem CT98014 entgegen und reduzierte mit seiner Anwesenheit die Noxa-Proteinspiegel. Die Teilnahme von ABT-737 an den verschiedenen Kombinationsbehandlungen scheint keinerlei Einfluss auf die in der Abbildung 41 getesteten Proteine zu haben. Zusätzlich wurde der Proteingehalt von A1 geprüft, da es für die Behandlung vor allem mit ABT-737 relevant sein könnte (ABT-737 bindet kein A1 (Oltersdorf *et al.* 2005)). Es konnte allerdings keine bedeutsame Veränderung in dem A1-Proteinspiegel nach der Stimulation mit den Agenzien festgestellt werden.

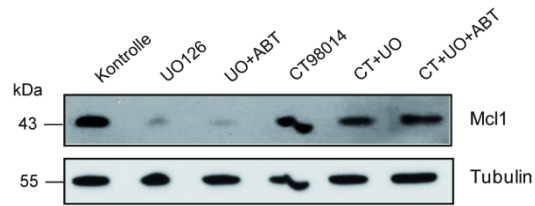


**Abbildung 41: Einfluss der Stimulation der Knock-down Melanomzellen mit UO126, ABT-737, CT98014 bzw. deren Kombination auf die Expression von Bim<sub>EL</sub>, Noxa und A1 sowie Phosphorylierung von ERK.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 1  $\mu$ M ABT-737 (ABT), 10  $\mu$ M UO126 (UO) oder 0,75  $\mu$ M CT98014 (CT) oder deren Kombinationen für 6 h stimuliert. CT98014 wurde immer 16 h vor der Behandlung mit UO126 oder ABT-737 zugegeben. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

In den Kontrollzellen wurde außerdem der Einfluss von UO126, ABT-737, CT98014 und deren Kombinationen auf das Mcl-1-Proteinniveau getestet. Wie es in der Abbildung 42 zu sehen ist, konnte erneut die Herunterregulation von Mcl-1 in Anwesenheit von UO126 nachgewiesen werden. Die Mcl-1-Expression scheint nach der CT98014-Stimulation unverändert zu sein, dafür aber ist diese ein wenig reduziert, sobald UO126 bzw. UO126/ABT-737 zusätzlich auf die Zellen wirken.





**Abbildung 42: Einfluss der Stimulation der shKontrollzellen mit UO126, ABT-737 und CT98014 auf die Mcl-1-Expression.**

Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 10  $\mu$ M UO126 (UO), 1  $\mu$ M ABT-737 (ABT) oder 0,75  $\mu$ M CT98014 (CT) oder deren Kombinationen für 6 h stimuliert. CT98014 wurde immer 16 h vor der Behandlung mit UO126 oder ABT-737 zugegeben. Die gewonnenen Gesamtzell-extrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine mittels Western Blot detektiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.



## 4 Diskussion

### **4.1 Die Kombination von Dacarbazin bzw. Fotemustin und ABT-737 führt zu synergistischer Apoptoseinduktion in Melanomzellen**

In dem ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung von vier Melanomzelllinien mit zwei in der klinischen Therapie zugelassenen Zytostatika Dacarbazin und Fotemustin nur zur geringen Apoptoseinduktion führt (Abbildung 9 und Abbildung 10). Eine gewisse Ausnahme gab es bei den Zelllinien 1205Lu und Sbcl2, die nach einer längeren Stimulation mit Fotemustin eine mäßige Apoptoserate zeigten. Die Monobehandlung aller Zelllinien mit dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 führte ebenfalls zu keiner gravierenden Erhöhung der Apoptoserate. Eine simultane Verwendung der erwähnten Zytostatika und ABT-737 ergab dagegen eine synergistische Erhöhung der Apoptose im Vergleich zur Monotherapie. Nach einer kürzeren Kombinationstherapie war eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellpopulation in den Zelllinien 1205Lu und WM35 zu beobachten (Abbildung 9). Dafür führte eine längere Stimulationsdauer mit Fotemustin bzw. Dacarbazin und ABT-737 zur Synergie in der Apoptoseinduktion in allen Melanomzelllinien (Abbildung 10).

Diese Experimente belegen, dass die Melanomzellen wenig Sensitivität für die Behandlung mit den zytotoxischen Agenzien aufweisen. Die Monotherapien mit Fotemustin bzw. Dacarbazin brachten keinen großen Erfolg bzgl. der Apoptoseinduktion. Das Ergebnis deckt sich mit den Daten aus zahlreichen klinischen Studien, welche das schlechte Ansprechen der Melanompatienten auf die klassische Chemotherapie bestätigen (Buzaid 2002; Eigentler *et al.* 2003; Tarhini und Agarwala 2006; Garbe *et al.* 2011). Zusätzlich stimmt der Befund, dass die Melanomzellen auf die Monostimulation mit ABT-737 resistent waren, ebenfalls mit früheren Beobachtungen überein (Miller *et al.* 2009). Der Befund, dass ABT-737 alleine keine Apoptose auslösen kann, ist nicht überraschend, da die hier verwendeten Melanomzellen ein leicht detektierbares Expressionsniveau von Mcl-1 zeigen (Weber *et al.* 2009). Ein niedriger Mcl-1-Expressionsspiegel wurde in vielen Studien für das positive Ansprechen auf die ABT-737-Monotherapie verantwortlich gemacht (Oltersdorf *et al.* 2005; Konopleva *et al.* 2006; van Delft *et al.* 2006; Okumura *et al.* 2008). Über die Synergie zwischen ABT-737 und verschiedenen anti-neoplastischen Agenzien wurde ebenfalls mehrfach berichtet (Oltersdorf *et al.* 2005; Konopleva *et al.* 2006; Kuroda *et al.* 2006; Chauhan *et al.* 2007; Kang *et al.* 2007; Kohl *et al.* 2007; Kuroda *et al.* 2007; Zall *et al.* 2010). Nichtsdestotrotz wurde hier das erste Mal über die erfolgreiche Kombinationstherapie aus dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 und den klassischen Chemotherapeutika in Melanomzellen berichtet.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das BH3-only Protein Noxa nach der Stimulation mit Dacarbazin und teilweise (aber in kleinerem Ausmaß) mit Fotemustin hochreguliert wird. In einer der zwei getesteten Zelllinien wurde außerdem eine leicht erhöhte Bim-Expression nach der Behandlung mit Dacarbazin beobachtet (Abbildung 11). Es ist keine allzu große Überraschung, dass die BH3-only Proteine durch die Verwendung von Dacarbazin und Fotemustin induziert werden, da eine Mehrheit der anti-neoplastischen Agenzien die apoptotischen Signalwege in der Zelle indirekt aktiviert (diskutiert bspw. in (Cory und Adams 2002; Cory *et al.* 2003)). Dacarbazin und Fotemustin sind beides DNA-alkylierende Agenzien, die eine Schädigung des Erbmaterials verursachen (Passagne *et al.* 2003; Marchesi *et al.* 2007). DNA-Schäden können zur Induktion des p53 Proteins und dessen Targets führen (Kaina *et al.* 2007). Damit lässt sich die beobachtete Hochregulation von Noxa möglicherweise erklären.

Die Beobachtung, dass die WM35- und 1205Lu-Zellen schon nach der kürzeren Stimulation mit Dacarbazin bzw. Fotemustin und ABT-737 eine deutliche Vermehrung der apoptotischen Zellpopulation aufwiesen (Abbildung 9), lässt sich evtl. mit dem sonst niedrigen Noxa-Expressionsspiegel der beiden Zelllinien erklären (Weber *et al.* 2009). Der Befund, dass die Zelllinie 451Lu auf die Mono- sowie Kombinationsbehandlungen reagiert (Abbildung 9 und Abbildung 10), könnte möglicherweise mit der Mutation im p53-Gen im Zusammenhang stehen (für Mutationsstatus der Zelllinien s. Kapitel 2.1.1.2). Noxa ist ein p53-Zielgen (Oda *et al.* 2000; Shibue *et al.* 2003) und da p53 in 451Lu mutiert ist, könnte die Noxa-Induktion in dieser Zelllinie eventuell gestört sein. Das könnte nach der Stimulation dieser Zellen mit Fotemustin der Fall sein. Die Hochregulation von Noxa nach der Fotemustin-Behandlung zeigte sich in der Zelllinie 451Lu viel schwächer ausgeprägt als bei den 1205Lu-Zellen (Abbildung 11).

Die essentielle Rolle von Noxa in der Dacarbazin/ABT-737-induzierten Apoptose konnte anhand der Knock-down Melanomzelllinien bestätigt werden (Abbildung 12). In der Abwesenheit von Noxa konnte gegenüber der Antwort der Zellen mit Kontrollvektor eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellpopulation nach einer Stimulierung mit Dacarbazin, sowohl mit als auch ohne ABT-737, beobachtet werden. Die stabile Herunterregulation von Bim hat nur bei der Monobehandlung mit Dacarbazin zum bedeutsamen Abfall der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen geführt.

Der Fotemustin/ABT-737-induzierte apoptotische Zelltod konnte dagegen weder durch die Abwesenheit von Bim noch von der von Noxa beeinflusst werden (Abbildung 13). Lediglich bei einer sehr kurzen Stimulationsdauer scheint Noxa, jedoch nicht Bim erforderlich zu sein (Abbildung 13, links). Nach der längeren Behandlungszeit war keines der Proteine für die Fotemustin/ABT-737-induzierte Apoptose notwendig (Abbildung 13, rechts). Für den durch Fotemustin-Monotherapie-induzierten apoptotischen Zelltod dagegen war mindestens eines

der beiden BH3-only Proteine nötig: RNAi gegen entweder Bim oder Noxa reduzierte die apoptotische Antwort signifikant.

Es konnte also ein Unterschied zwischen der Fotemustin- und der Dacarbazin-induzierten Apoptose beobachtet werden. Für die Sensibilisierung gegenüber ABT-737 ist der Funktionsverlust von Mcl-1 erforderlich. Während bei dem Dacarbazin-vermittelten apoptotischen Zelltod hierfür Noxa notwendig ist, sind offenbar in der Fotemustin-induzierten Apoptose weder Bim noch Noxa allein für die Neutralisierung von Mcl-1 verantwortlich. In der Abwesenheit von ABT-737 induzierte Fotemustin deutlich Apoptose in Melanomzellen, und hierfür waren sowohl Bim als auch Noxa notwendig, da RNAi gegen eines der beiden Proteine Apoptose klar verringert. Es scheint daher wahrscheinlich, dass beide Proteine an der Apoptoseinduktion durch Fotemustin und ABT-737 beteiligt sind; möglicherweise würde RNAi gegen beide zugleich diese Form der Apoptose inhibieren. Während der Kombinationsbehandlung mit ABT-737 und Dacarbazin ist Noxa notwendig, nicht jedoch Bim. Es wurde auch früher berichtet, dass das hochregulierte Bim eher an die anti-apoptotischen Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>L</sub> bindet als an Mcl-1 (Chen *et al.* 2009). Darüber hinaus ist die Bim-vermittelte Apoptose nicht mit der Mcl-1-Degradation verbunden (Czabotar *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte eher eine Bindung von Mcl-1 an Noxa als eine von Mcl-1 an Bim sowohl nach der Stimulation mit Dacarbazin als auch ohne Behandlung durch die Immunopräzipitation nachweisen (nicht publizierte Daten).

Bei der Stimulation mit Fotemustin und ABT-737 war Noxa nur zu einem sehr frühen Zeitpunkt unersetzbar. Eine Möglichkeit ist, dass Bim-Aktivität durch die Behandlung mit Fotemustin auf eine andere Weise als im Fall von Dacarbazin-Stimulation induziert wird. Insbesondere ist es eine bislang nicht untersuchte Möglichkeit, dass Bim bei der Fotemustin-Behandlung durch den Verlust anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine und seine korrelierende Freisetzung aktiviert wird. Im Fall der Fotemustin-Behandlung könnte eine „starke“ Bim-Aktivierung ausreichen, um Mcl-1 zu neutralisieren, so dass Noxa nicht notwendig ist (und umgekehrt ebenso). Möglicherweise induziert Fotemustin zusätzlich noch andere BH3-only Proteine, welche diese Aufgabe in Abwesenheit von Noxa übernehmen können. *In vitro* Studien zeigen, dass Bim, Bid und möglicherweise noch Puma alle anti-apoptotischen Proteine binden und somit neutralisieren können (diskutiert bspw. in (Willis und Adams 2005)). Interessanterweise wird Bim nach der Stimulation mit Fotemustin zumindest nicht deutlich induziert. Allerdings korreliert der hohe Proteinspiegel von Bim nicht immer mit einer hohen Aktivität des Proteins und es wurde auch von der Reduktion der Apoptose trotz Bim-Hochregulation berichtet (Bauer *et al.* 2007). Die Proteinspiegel von Puma bleiben nach der Stimulation mit Fotemustin eher unverändert. Es wäre eventuell von Interesse zusätzlich eine mögliche Hochregulation von Bid zu überprüfen.

Die Synergie von Noxa und ABT-737 in der Apoptoseinduktion von Melanomzellen konnte auf der mitochondrialen Ebene nachvollzogen werden (Abbildung 14). Die Vorstimulation der Zellen mit Fotemustin und Dacarbazin sensibilisierte Mitochondrien für die ABT-737-induzierte Freisetzung von Cytochrom c. Das Gleiche ist nach der simultanen Inkubation der nicht-vorstimulierten permeabilisierten Melanomzellen mit der Kombination aus dem Noxa-BH3-Peptid und ABT-737 bzw. Bad-BH3-Peptid geschehen.

Dieses Ergebnis kann mit dem Modell der Kooperation zwischen den schwächeren BH3-only Proteinen erklärt werden, die als selektive Binder für die anti-apoptotischen Mitglieder fungieren (s. Kapitel 1.1.3.2 und (Chen *et al.* 2005; Willis *et al.* 2005)). Die „Displacement“ Theorie sagt hierbei, dass alle anti-apoptotischen Bcl-2-artigen Proteine durch die pro-apoptotischen BH3-only Mitglieder neutralisiert werden müssen, um eine erfolgreiche Aktivierung der Effektoren Bax/Bak zu gewährleisten. Nachdem die verwendeten Chemotherapeutika Noxa hochregulieren, welches darauf die anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und A1 bindet (Chen *et al.* 2005; Certo *et al.* 2006), kann ABT-737 demzufolge durch die Neutralisation der anderen Bcl-2-artigen Mitglieder (Oltersdorf *et al.* 2005) zur Cytochrom c-Freisetzung führen. Folglich zeigen diese Experimente, dass die Vorstimulation mit Dacarbazin bzw. Fotemustin den gleichen Effekt erzielen kann wie die Stimulation der permeabilisierten Zellen mit dem Noxa-BH3-Peptid.

Frühere Befunde, wonach das Bim-BH3-Peptid aus unbehandelten, isolierten Mitochondrien Cytochrom c freisetzen kann (Letai *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005; Kuwana *et al.* 2005), konnten hier bestätigt werden. Bereits die Inkubation der unbehandelten permeabilisierten Zellen mit dem BH3-Peptid von Bim führte zur Zerstörung der mitochondrialen Außenmembran. Eine ähnliche pro-apoptotische Kraft des BH3-Peptids vom Bim wurde auch an Mitochondrien aus Mausleberzellen und Krallenfroscheiern gezeigt (Kuwana *et al.* 2005; Uren *et al.* 2007). Es soll hier jedoch erwähnt werden, dass die im Cytochrom c-Freisetzungssassay verwendenden BH3-Peptide der endogenen Gesamtlängeproteine nicht ganz entsprechen. Es ist ebenfalls wesentlich, dass einige neuere Arbeiten darauf hindeuten, dass die BH3-Domäne nicht die einzige entscheidende Struktur von BH3-only Proteinen ist (z. B. (Weber *et al.* 2007; Hagenbuchner *et al.* 2010)). Daher kann man die Bedeutung des Bim-BH3-Peptids auf der mitochondrialen Ebene und des endogenen Proteins im zellulären Milieu nicht gleichstellen.

Die wichtigste Wirkung sowohl von Fotemustin als auch von Dacarbazin in den Melanomzellen ist offensichtlich die Neutralisation von Mcl-1. Überraschenderweise war keine Herunterregulation des Mcl-1-Proteinspiegels nach Stimulation mit den Chemotherapeutika nachzuweisen. Ähnliches wurde in einer Studie aus unserem Labor beschrieben, wo die Hochregulation von Noxa zur Synergie zwischen ABT-737 und verschiedener Zytostatika in Nierenzellkarzinomlinien führte, ohne dabei den Mcl-1-

Proteinspiegel zu beeinflussen (Zall *et al.* 2010). Es wurde auch über die Überexpression von Noxa im kleinzelligen Lungenkarzinom berichtet, die ebenfalls keinen Einfluss auf die exprimierte Mcl-1-Proteinmengen aufwies (Hauck *et al.* 2009). Möglicherweise hat hier bei der Dacarbazin- bzw. Fotemustin-ABT-737-vermittelten Apoptose daher keine Degradation, sondern eine Noxa-abhängige Neutralisation von Mcl-1 stattgefunden.

Zusammenfassend bestätigen diese Daten, dass die aus Patientenproben gewonnenen Melanomzelllinien der klassischen Chemotherapie gegenüber sehr resistent sind. Allerdings deuten die Daten darauf hin, dass eine oft ineffiziente Behandlung des malignen Melanoms mit klassischen Zytostatika durch die Kombination mit den neuartigen Bcl-2-Antagonisten wie ABT-737 verbessert werden konnte. Molekular spielt hierbei die Induktion des BH3-only Proteins Noxa, welches hier höchstwahrscheinlich das anti-apoptotische Bcl-2-artige Protein Mcl-1 neutralisiert, eine entscheidende Rolle. Somit scheint die hier gezeigte Synergie zwischen den chemotherapeutischen Agenzien Dacarbazin bzw. Fotemustin und dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 auf der simultanen Neutralisation aller anti-apoptotischen Proteine zu basieren: Bcl-2, Bcl-w und Bcl-x<sub>L</sub> durch ABT-737 sowie Mcl-1 durch die Dacarbazin/Fotemustin-vermittelte Hochregulation von Noxa.

#### **4.2 LBW242 sensibilisiert Melanomzelllinien für die TLR3-vermittelte Apoptose**

Die Stimulation des Toll-like Rezeptors 3 (TLR3) mit Poly I:C führte in den Melanomzelllinien zu einer geringen bis mäßigen Apoptose (Abbildung 15). Auch wenn die TLR3-mRNA-Spiegel nach der Stimulation mit Poly I:C in drei der vier verwendeten Melanomzellen deutlich gestiegen sind (Weber *et al.* 2010), konnte dieser Vorgang alleine den apoptotischen Zelltod nicht hervorrufen. Ein Inhibitor der Proteinbiosynthese Cycloheximid (CHX) kann verschiedene Tumorzellen für die TLR3-vermittelte Apoptose sensibilisieren (Jiang *et al.* 2008). Dies wurde hier in den Melanomzellen untersucht und der Versuch zeigte sich erfolgreich. Alle vier Melanomzelllinien wiesen eine signifikante Erhöhung der Apoptose nach einer kombinierten Stimulation mit Poly I:C und CHX im Vergleich zu den einzelbehandelten Zellen auf (Abbildung 15). Poly I:C alleine kann also keinen apoptotischen Zelltod in den Melanomzellen hervorrufen, kann es jedoch nach Inhibition der Proteinbiosynthese.

Der Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signalweg führt über die Initiator-Caspase-8 (Ashkenazi 2002). Die Tatsache, dass diese Protease in den HaCaT Keranozyten nach der Stimulation mit Poly I:C gespalten war (Weber *et al.* 2010), lieferte Hinweise darauf, dass diese auch bei der TLR3-vermittelten Apoptose in den Melanomzellen eine wichtige Rolle spielen könnte. Nach Herunterregulation von Caspase-8 nach RNAi wurde bei Poly I:C/CHX-Stimulation eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellpopulation in drei von vier getesteten Zelllinien

im Vergleich zu den gleich stimulierten Kontrollzellen nachgewiesen (Abbildung 16). Die Abwesenheit von Caspase-8 in der Zelllinie 1205Lu führte, trotz der relativ effizienten Herunterregulation auf der Proteinebene (Abbildung 17), zu keiner Verminderung der durch Poly I:C/CHX-induzierten Apoptose. Wahrscheinlich kann in diesen Zellen noch ein anderes Protein (möglicherweise die mit der Caspase-8 teilweise funktionell redundante Caspase-10 (Chen und Wang 2002)) zum Poly I:C/CHX-vermittelten apoptotischen Zelltod beitragen. Diese Vermutung wird vor allem durch die Tatsache verstärkt, dass die Spaltung der Caspase-8 nach der Stimulation mit Poly I:C und CHX in der 1205Lu-Zelllinie eher mäßig ausfiel (Abbildung 18). Am stärksten wurde Caspase-8 nach der Poly I:C/CHX-Stimulation in Sbc12-Zellen gespalten (Abbildung 18), was mit der höchsten hervorgerufenen Apoptose in dieser Zelllinie übereinstimmt (vergleiche mit Abbildung 15). Der Poly I:C/CHX-vermittelte apoptotische Zelltod ist somit beinahe in fast allen Melanomzellen eng mit der Aktivierung der Caspase-8 verbunden. Dagegen ist die Rolle des Inhibitors von Caspase-8 FLIP<sub>L</sub> in der Poly I:C/CHX-vermittelten Apoptose vermutlich marginal: Die Behandlung mit CHX führte zu keiner konsistent messbaren Verringerung der cFLIP-Proteinspiegel.

Der Befund, dass Proteinbiosynthese Zellen für den TLR3-induzierten apoptotischen Zelltod sensibilisiert, lässt vermuten, dass normalerweise die Expression eines anti-apoptotischen Proteins den extrinsischen Apoptose-Signalweg in den Melanomzellen blockiert. Die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) wurden als indirekte Hemmer der Caspase-8-Aktivierung nach der TNFR1-Stimulation mehrfach beschrieben ((Wang *et al.* 1998) und die neueren Erkenntnisse diskutiert in (Wu *et al.* 2007)). Dass die Blockierung der IAP-Expression durch CHX zur Sensibilisierung von Melanomzellen für die Poly I:C-vermittelte Apoptose beiträgt, wurde in den in Abbildung 19 dargestellten Experimenten gezeigt. Die Stimulation der Melanomzellen mit CHX verursachte eine deutliche Herunterregulation von cIAP1 in zwei Zelllinien und eine mäßige Abnahme der cIAP1-Expression in einer der getesteten Zelllinien. Die Proteinspiegel von XIAP schienen dagegen durch die Verwendung von CHX nicht beeinflusst zu sein. Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass CHX die Melanomzellen für die Poly I:C-induzierte Apoptose sensibilisiert, indem es die Expression von cIAP1 unterdrückt.

Der Poly I:C/CHX-induzierte apoptotische Zelltod war durch Bafilomycin-A, den Inhibitor der Endosomenreifung in der Zelle, blockierbar (Weber *et al.* 2010). Dies weist darauf hin, dass ein endosomales Signal erforderlich war. Ein solches Muster ist für TLR3 typisch: dieser Rezeptor signalisiert tatsächlich nach Aufnahme von Poly I:C aus der endosomalen Membrane (Matsumoto *et al.* 2003).

Die Teilnahme der cIAPs an TLR3-vermittelter Apoptose wurde durch Experimente mit dem Smac-Mimetikum LBW242 bestätigt. Die Stimulation der Melanomzellen mit der Kombination aus Poly I:C und LBW242 resultierte in einer sehr deutlichen Apoptose-Erhöhung im



Vergleich zu den einzelstimulierten Zellen (Abbildung 20 und Abbildung 21). In zwei der vier getesteten Melanomzelllinien war sogar eine gewaltige Zunahme der apoptotischen Population nach der Kombinationsstimulation mit Poly I:C und LBW242 zu sehen. Dies könnte daran liegen, dass die WM35-Zelllinie bereits auf Behandlung mit LBW242 alleine gut ansprechbar war und die Sbc12-Zelllinie auf die Poly I:C-Monostimulation relativ sensitiv reagiert hat (Abbildung 20). Am niedrigsten wurde die Apoptoserate bei den 451Lu-Zellen nach der Poly I:C/LBW242-Stimulation gemessen. Dies ist wahrscheinlich das Resultat einer sehr niedrigen TLR3-mRNA-Expression nach der Poly I:C-Stimulation in dieser Zelllinie (Weber *et al.* 2010). Folglich kann man daraus schließen, dass LBW242 (ähnlich wie CHX, nur stärker) die Melanomzellen für den TLR3-vermittelten apoptotischen Zelltod sensibilisiert. Erwartungsgemäß reduzierte LBW242 die cIAP-Proteinspiegel in den verwendeten Melanomzelllinien (Abbildung 22). Die Expression von cIAP1 wurde bereits sehr früh reduziert und diese Minderung hielt relativ lange an. Interessanterweise konnte nach einer anfänglichen Herunterregulation der cIAP2-Expression eine Steigung des cIAP2-Proteinspiegels beobachtet werden. Nachdem cIAP2 eine der Ubiquitinierungszielstrukturen von cIAP1 ist (Conze *et al.* 2005; Cheung *et al.* 2008) und die cIAP1-Expression durch die Verwendung von LBW242 vermindert wurde, fehlte nach gewisser Zeit der negative Regulator von cIAP2 und möglicherweise stiegen deshalb seine Proteinspiegel wieder an. *cIAP2* ist weiterhin ein NF- $\kappa$ B-induzierbares Gen, und Smac-Mimetika führen in vielen Zellen zur Aktivierung des (alternativen) NF- $\kappa$ B-Weges. Dieser Mechanismus könnte ebenfalls an der Induktion von cIAP2 beteiligt sein.

Die hohen Expressionsspiegel von XIAP wurden durch die Behandlung mit LBW242, genauso wie nach der CHX-Stimulation, nicht verändert. *In vitro* Experimente haben dagegen die Bindung von LBW242 an die BIR3-Domäne von XIAP gezeigt (Sharma *et al.* 2006). Eventuell ist die Bindung von diesem Smac-Mimetikum unter physiologischen Bedingungen anders als in den *in vitro* Experimenten oder die Bindung alleine reicht nicht aus um XIAP-Proteinspiegel zu reduzieren. Ob die Bindung XIAP inaktiviert, ist ebenfalls unklar. Zusätzlich könnte der Einfluss von LBW242 auf die zellulären Komponenten Zelltyp-abhängig sein. Folglich zeigen die oben beschriebenen Daten, dass die zellulären IAPs (vor allem cIAP1 und zum Teil cIAP2) für die Initiation der Poly I:C/LBW242-induzierten Apoptose in Melanomzellen verantwortlich sind.

Abbildung 22 erklärt möglicherweise die oben bereits erwähnte Sensitivität der WM35-Zellen gegenüber der LBW242-Monobehandlung. Der relativ hohe cIAP1-Expressionsspiegel wird in dieser Zelllinie durch die LBW242-Stimulation sehr effizient vermindert, was für die Induktion einer mäßigen Apoptose ausreichend zu sein scheint.

Der wichtige Beitrag von cIAP1 zum Poly I:C/LBW242-abhängigen apoptotischen Zelltod ist in WM35-Zellen deutlich zu erkennen (Abbildung 23). Die transiente Herunterregulation von

cIAP1 durch RNAi, wie sie auch durch die Stimulation mit CHX (Abbildung 19) und LBW242 (Abbildung 22) erfolgte, ging mit einer signifikanten Zunahme der apoptotischen Zellpopulation nach der Poly I:C-Monobehandlung im Vergleich zu den gleich behandelten Kontrollzellen einher. Dies zeigt, dass die Abnahme des cIAP1-Proteinspiegels genügt, um die WM35-Zellen für die Poly I:C-vermittelte Apoptose zu sensibilisieren.

Die LBW242-vermittelte Inhibition von cIAPs resultierte in der Spaltung von Caspase-8 (Abbildung 24). Die aktivierungsassoziierten Spaltprodukte konnten bereits nach kurzer Stimulation detektiert werden und waren am meisten in diesen Zelllinien ausgeprägt, in denen auch die höchste Poly I:C/LBW242-induzierte Apoptoserate vorher gemessen wurde (vergleiche mit Abbildung 21). Nach der Einzelstimulation der Zellen mit Poly I:C bzw. LBW242 konnte dagegen keine Caspase-8-Spaltung beobachtet werden (Abbildung 25). Das erklärt, warum die Monobehandlung weder mit Poly I:C noch mit LBW242 keine Effizienz in der Apoptoseinduktion in den Melanomzellen zeigte. Lediglich in der Sbc12-Zelllinie war eine schwache Bande eines Caspase-8-Spaltprodukts nach Poly I:C-Stimulation zu erkennen, was mit der relativ großen Sensibilität der Zellen dem TLR3-Ligand gegenüber korrelierte (vergleiche Abbildung 20). Demzufolge zeigen diese Ergebnisse, dass die Zusammenarbeit zwischen Poly I:C und LBW242 mit der Stärke der Caspase-8-Spaltung korreliert.

Die Rolle der Caspase-8 in der Poly I:C/LBW242-induzierten Apoptose wurde zusätzlich durch RNAi-Experimente bestätigt. In Abwesenheit von Caspase-8 wurde nach der Kombinationsbehandlung mit Poly I:C und LBW242 in allen getesteten Zelllinien eine signifikante Reduktion der apoptotischen Vorgänge im Vergleich zu den gleich stimulierten Kontrollzellen nachgewiesen (Abbildung 26). Somit ist die auf der Proteinebene beobachtete Spaltung der Caspase-8, welche sich nach der Poly I:C/LBW242-Stimulation ereignete, mit der proteolytischen Caspase-8-Aktivität in der Zelle verbunden.

Die Proteinspiegel von FLIP<sub>L</sub> blieben (ähnlich wie im Fall der Poly I:C/CHX-Stimulation) nach der Behandlung mit Poly I:C und LBW242 in den zwei sensitiveren Zelllinien unverändert. Dafür stiegen sie in den anderen zwei Zelllinien, welche resistenter auf die Kombinationsstimulation reagierten, sehr leicht an (Abbildung 26). Interessanterweise wurden ähnliche Beobachtungen für den TNF $\alpha$ -abhängigen Zelltod gemacht (Wang *et al.* 2008). Laut dieser Studie wird Caspase-8 durch CHX über die Eliminierung vom FLIP aktiviert. Dagegen führen die Smac-Mimetika zur Caspase-8-Aktivierung über die Autodegradation von cIAPs und die dadurch resultierte Freisetzung von RIP1 aus dem aktivierten TNFR-Komplex. RIP1 kann schließlich zusammen mit FADD und Caspase-8 einen Proteinkomplex bilden und demzufolge diese Initiatorcaspase aktivieren. Darüber hinaus kann die cIAP-abhängige Aktivierung der Caspase-8 in den untersuchten Zellen nicht durch das endogene FLIP blockiert werden (Wang *et al.* 2008). cFLIP wird stark durch NF-

kB-Aktivität reguliert (Kreuz *et al.* 2004). Der leichte Anstieg des Proteins nach LBW242-Behandlung ist vermutlich auf diesen Effekt zurückzuführen. Endogene Spiegel von cFLIP können also die TLR3-abhängige Apoptose nicht blockieren; allerdings zeigen neuere Arbeiten unseres Labors, dass RNAi gegen cFLIP einen deutlichen sensibilisierenden Effekt gegenüber Poly I:C/LBW242 hat (Dr. Arnim Weber, persönliche Mitteilung).

Durch die Expression des viralen Caspase-8-Inhibitors CrmA (*caspase-8 inhibitor from cowpox virus*) konnte in zwei ausgewählten Melanomzelllinien die Poly I:C/LBW242-vermittelte Apoptose gehemmt werden (Weber *et al.* 2010). Das Gleiche gilt für den apoptotischen Zelltod, der durch ein anderes Smac-Mimetikum, das Compound A, in Tumorzellen hervorgerufen war (Vince *et al.* 2007).

Die durch Monotherapie mit Smac-Mimetika induzierte Apoptose wurde in anderen Studien mit der autokrinen TNF $\alpha$ -Sekretion in Verbindung gebracht (Petersen *et al.* 2007; Varfolomeev *et al.* 2007; Vince *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008). Hier dagegen konnte keine Sekretion von TNF $\alpha$  nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was die unterschiedlichen Wirkweisen von Smac-Mimetika in den verschiedenen Zelltypen zeigt. Im Falle der Monotherapie ist TNF notwendig, um Caspase-8 zu aktivieren; im Falle der Poly I:C-induzierten Apoptose wird dieses Signal durch TLR3 vermittelt. In beiden Fällen ist der Verlust von cIAPs notwendig, damit diese Signale Caspase-8 effizient aktivieren können. Diese Daten zeigen also, dass eine Ähnlichkeit zwischen der TLR3- und der TNFR1-vermittelten Apoptose besteht, indem die cIAPs in der Aktivierung von Initiatorcaspase eine essentielle Rolle spielen. Aller Wahrscheinlichkeit nach kann TRIF (der Signaladaptor von TLR3) TRADD rekrutieren (Ermolaeva *et al.* 2008). TRADD ist ebenso am TNF-Signalkomplex beteiligt, und die Caspase-8-aktivierenden Komplexe nach TNF und nach TLR3-Signal sind daher sich wohl zumindest ähnlich.

Es wurde verschiedentlich beschrieben, dass TRIF Elemente aus dem TNF-abhängigen apoptotischen Signalweg (vermutlich TRADD-anhängig) rekrutieren kann. Die Kinase RIP1 und das Adaptorprotein TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*) können nicht nur mit TNFR1- sondern auch mit TLR3-Komplexen assoziiert sein (Meylan *et al.* 2004; Ermolaeva *et al.* 2008). Die Initiation von Apoptose über die Todesrezeptoren sowie über TNFR1 benötigt eine Formation von Multi-Protein-Komplexen (der sog. DISC im Fall des extrinsischen Apoptosesignalweges, etwa nach Fas-Signal (Ashkenazi 2002) bzw. der Komplexe I und II nach der TNFR1-Aktivierung (Micheau und Tschopp 2003)). Manche Bestandteile des DISC wie Caspase-8 oder FADD sind bei DISC und bei dem Komplex II gemeinsam. Auch TRIF kann Caspase-8 über FADD aktivieren (Ruckdeschel *et al.* 2002; Haase *et al.* 2003; Ruckdeschel *et al.* 2004; Kaiser und Offermann 2005). Es ist zwar noch nicht ganz geklärt, wie das geschieht, aber die Kinase RIP1 ist mit einiger Sicherheit beteiligt

(Han *et al.* 2004; Ruckdeschel *et al.* 2004; Kaiser und Offermann 2005). Dabei dürfte die komplexe Ubiquitinierung von RIP1 eine Rolle spielen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten lassen vermuten, dass auch nach der Ligand-vermittelten TLR3-Aktivierung und der Rekrutierung von TRIF ein ähnlicher pro-apoptotischer Proteinkomplex entsteht, dessen wesentliche Aktivität die Aktivierung von Caspase-8 ist. Die hier durchgeführten Experimente deuten außerdem sehr stark darauf hin, dass der Erfolg des Komplexes in der Initialisierung der Caspasenkaskade von den zellulären IAPs abhängt. Über die anderen Komponenten (abgesehen von Caspase-8, FADD und IAPs) dieses Komplexes kann man nur spekulieren. Nachdem cIAPs an TRAF2 binden können und in den TNFR1-initiierten Komplexen I und II TRAF vorhanden sind (Rothe *et al.* 1995), könnte auch hier TRAF2 die Brücke zwischen den cIAPs und dem Rest des Komplexes bilden. Ob TRIF genauso wie Fas den Adaptor FADD direkt rekrutieren kann (Strasser *et al.* 2009) oder ob zusätzlich TRADD, der in dem TNFR1-vermittelten Zelltod quasi proximal vom FADD fungiert (Hsu *et al.* 1995; Hsu *et al.* 1996), für die TLR3-vermittelten Apoptose (wie von (Ermolaeva *et al.* 2008) bereits vorgeschlagen) benötigt wird, bleibt letztlich unklar. Die Beteiligung der erwähnten und möglicher weiterer Komponenten an der Bildung des TLR3/TRIF-initiierten Proteinkomplexes muss weiter analysiert werden.

Ein anderer TLR3-Ligand Poly A:U (polyadenylische:polyuridyliche Säure) erzeugte einen ähnlichen zellulären Effekt auf die Melanomzellen wie Poly I:C (Abbildung 27). Diese Beobachtung bekräftigt die frühere Annahme, dass der Poly I:C-induzierte apoptotische Signalweg tatsächlich über TLR3 erfolgt. Allerdings induzierte die Kombination aus Poly A:U und LBW242 eine geringere Apoptose in den Melanomzellen als die Poly I:C/LBW242-Behandlung (vergleiche Abbildung 21). Die Vermutung, dass Poly A:U ein „reiner“ TLR3-Ligand ist und Poly I:C dagegen zusätzlich über die anderen dsRNA-Erkennungsmoleküle wie MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) und RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) von der Zelle wahrgenommen werden kann (Perrot *et al.* 2010), könnte diesen Unterschied in der Apoptoseinduktion erklären. MDA5 und RIG-I sind beides zytosolische Helikasen, allerdings während MDA5 Poly I:C erkennt, werden *in vitro* transkribierte dsRNAs von RIG-I erkannt (Kato *et al.* 2006). Aktivierung von MDA5 und RIG-I ist für die Induktion von Typ I-Interferon in den Keranozyten verantwortlich (Kalali *et al.* 2008) und tatsächlich erfolgte die Stimulation mit Poly I:C und nicht mit Poly A:U in einer IFN- $\gamma$ -Induktion in den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Perrot *et al.* 2010). Das BH3-only Protein Noxa gehört zu den Targets von IFN- $\gamma$  (Sun und Leaman 2005) und es wurde eine Noxa-Induktion in den Poly I:C-stimulierten HaCaT Keranozyten nachgewiesen, die allerdings für Poly I:C-induzierte Apoptose nicht notwendig war (Weber *et al.* 2010). Somit könnte eventuell die potentere Zelltodinduktion durch Poly I:C/LBW242 im Vergleich zu der Poly A:U/LBW242-

vermittelten Apoptose auch in den Melanomzellen an der zusätzlichen MDA5-vermittelten Noxa-Hochregulation liegen.

Die hier präsentierten Daten belegen trotz TLR3-Expression eine große Resistenz der Melanomzellen gegenüber dem TLR3-Liganden Poly I:C. Das wichtigste Ereignis, welches *downstream* von TLR3 und seinem Adaptormolekül TRIF erfolgen muss, um die Caspasenkaskade zu induzieren, ist höchstwahrscheinlich die Bildung eines Proteinkomplexes, welcher die Caspase-8 aktiviert. Die Auslösung der Apoptose durch die Stimulation von TLR3 in den Melanomzellen erfolgt effizient nach Inhibition von cIAPs entweder durch den Translationshemmer CHX oder durch das Smac-Mimetikum LBW242. Somit fungieren die IAPs in dem Poly I:C/LBW242-induzierten apoptotischen Zelltod der Melanomzellen als negative Regulatoren der Caspase-8-Aktivierung.

### **4.3 Die Kombinationsbehandlung mit UO126 und ABT-737 induziert Apoptose in Melanomzellen**

Die Signalkaskade der MAP-Kinasen ist in vielen Tumoren inklusive des malignen Melanoms hyperaktiv (Hoshino *et al.* 1999). In den transformierten Melanozyten sind die Mutationen in den Kinasen RAS und vor allem RAF für das andauernde Anschalten des Signalweges verantwortlich (Davies *et al.* 2002). Die Blockierung des Überlebenssignalweges bspw. durch die Hemmung einer MAP-Kinase MEK könnte einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen.

Die Stimulation der Melanomzelllinien mit dem MEK-Inhibitor UO126 induzierte Apoptose nur im geringen Ausmaß. Eine deutliche Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation wurde in einer Zelllinie nach einer kürzeren Behandlung (Abbildung 28) und in allen Zelllinien nach einer längeren Stimulation (Abbildung 29) beobachtet, sobald UO126 zusammen mit dem Bcl-2-Antagonist ABT-737 verwendet wurde. Von den vier getesteten Zelllinien reagierten die 451Lu-Zellen auf die UO126/ABT-Kombinationsbehandlung am empfindlichsten.

Diese Daten zeigen, dass die Inhibition des MAPK-Signalweges alleine nicht ausreicht um die Apoptose in den sehr resistenten Melanomzellen zu induzieren. Dennoch kann ABT-737 die Zellen für die UO126-vermittelte Apoptose sensibilisieren. Auch die Tatsache, dass die drei der verwendeten Zelllinien eine *BRAF*- und eine der verwendeten Zelllinien eine *NRAS*-Mutation aufweisen (der Mutationsstatus der Zelllinien im Kapitel 2.1.1.2), hat die Sensitivität der Zellen gegenüber UO126 nicht verbessert. Es wurde vorgeschlagen, dass die Tumore mit einer *BRAF*-Mutation viel empfindlicher auf die MEK-Inhibition als anders mutierte Tumorzellen reagieren (Solit *et al.* 2006). Diese Vermutung konnte hier allerdings nicht bestätigt werden. Sbc12-Zellen, welche keine *BRAF*-Mutation, sondern eine Mutation im *NRAS*-Gen haben, waren ähnlich unempfindlich auf die UO126-Monobehandlung wie die anderen Zelllinien. Die Zelllinie 451Lu, dessen UO126/ABT-737-vermittelte Apoptose am

höchsten ausfiel, trägt eine *BRAF*-Mutation und war der UO126-Monotherapie gegenüber am sensitivsten. Nichtsdestotrotz bewegte sich die Apoptoserate von den anderen *BRAF*-mutierten Zelllinien (WM35 und 1205Lu) und der *NRAS*-mutierten *Sbcl2*-Zellen in einem ähnlichen Bereich. Demzufolge konnte hier keine Korrelation zwischen der vorhandenen *BRAF*-Mutation und der Sensitivität gegenüber MEK-Inhibitor nachgewiesen werden.

Eine Untersuchung von 170 verschiedenen Melanomzellen (vor allem aus Patientenproben, aber auch ein paar Zelllinien wurden verwendet) ergab ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von phosphoryliertem ERK und dem *BRAF*- bzw. *NRAS*-Mutationsstatus der Zellen (Houben *et al.* 2008). Auch Smalley und Kollegen haben keine Korrelation zwischen der MEK-Inhibition und dem Mutationsstatus der Tumorzellen gefunden (Smalley *et al.* 2006). Die Autoren schlagen dagegen vor, dass die Entwicklungsstufen des Tumors für die Empfindlichkeit auf die MEK-Inhibition ausschlaggebend sind. Nicht-metastasierte Melanome waren auf die Behandlung mit zwei MEK-Inhibitoren (UO126 und PD98059) sensitiv und die metastatischen Zelllinien dagegen resistent. Interessanterweise wurden drei der hier analysierten Melanomzelllinien (WM35, 1205Lu und 451Lu) auch in obiger Studie verwendet. Während WM35-Zellen in der erwähnten Veröffentlichung gegenüber UO126 sensitiv waren, wurden die 1205Lu- und die 451Lu-Zellen als resistent eingestuft (Smalley *et al.* 2006). Die von Smalley *et al.* publizierten Ergebnisse konnten in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die Melanomzellen der frühen Entwicklungsphase (WM35) zeigten hier eine ähnliche Resistenz der UO126-Monobehandlung gegenüber und eine vergleichbare Sensitivität auf die UO126/ABT-737-Kombinationstherapie wie die metastatischen Melanomzellen (1205Lu). Darüber hinaus reagierte die von Smalley und Kollegen als resistent eingestufte 451Lu-Zelllinie auf UO126-Monotherapie sowie auf die Kombination aus UO126 und ABT-737 in den hier präsentierten Experimenten am empfindlichsten (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Nachdem ABT-737 die Melanomzellen für die UO126-vermittelte Apoptose sensibilisieren und ABT-737 kein Mcl-1 neutralisieren kann (Oltersdorf *et al.* 2005), wurde vermutet, dass UO126 die Mcl-1-Proteinspiegel beeinflussen könnte. Da Noxa an der Mcl-1-Degradation beteiligt sein kann (Willis *et al.* 2005), wurde zusätzlich die Expression des BH3-only Proteins analysiert. Es konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass UO126 die Proteinmengen von Mcl-1 stark reduziert (Abbildung 30). Interessanterweise wurden die Proteinspiegel von Noxa durch UO126 nicht hochreguliert, sondern waren ebenso reduziert. Auch wenn ursprünglich über den Mcl-1-Abbau als Folge der Noxa-Überexpression berichtet wurde (Willis *et al.* 2005), war in anderen Studien dagegen eine Mcl-1-Degradation trotz der erhöhten Noxa-Proteinspiegel nicht immer nachweisbar (beobachtet bspw. in (Weber *et al.* 2009; Weber *et al.* 2010; Zall *et al.* 2010)). Man könnte hier über eine UO126-initiierte Ko-Degradation des entstandenen Noxa:Mcl-1-Komplexes spekulieren (Czabotar *et al.* 2007;

Ploner *et al.* 2009), was die simultane Reduktion der Mcl-1- und Noxa-Proteinspiegel nach der UO126-Behandlung erklären könnte. Während die Beteiligung von ERK an der Degradation von Bim<sub>EL</sub> mehrfach beschrieben wurde (diskutiert in (Balmanno und Cook 2009)), ist der Einfluss der MEK-Inhibition auf den Mcl-1-Abbau nicht klar. In Kolonkrebszellen beispielsweise wurde nach UO126-Stimulation eine Hochregulation von Bim<sub>EL</sub> aber kein Mcl-1-Abbau beobachtet (Cragg *et al.* 2008). In Melanomzellen wurde dagegen eine Reduktion des Mcl-1-Proteinspiegels nach der Stimulation mit UO126 mehrfach beobachtet (Wang *et al.* 2007; Chetoui *et al.* 2008; Boisvert-Adamo *et al.* 2009).

Die Rolle von Bim und Noxa in der UO126/ABT-737-induzierten Apoptose wurde zusätzlich durch RNAi-Ansätze analysiert. Nach einer kurzen Stimulationsdauer konnte nur eine geringe und nicht signifikante Reduktion des UO126/ABT-737- sowie PD98059/ABT-737-vermittelten apoptotischen Zelltodes in den Bim- und Noxa-KD-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abbildung 31). Nach einer längeren Behandlungszeit vermittelte nur die Abwesenheit von Noxa und nicht die von Bim einen signifikanten Schutz gegen MEK-Inhibitor/ABT-737-induzierter Apoptose (Abbildung 32). Folglich scheint die Rolle von Bim für die MEK-Inhibitor/ABT-737-verursachte Apoptose unbedeutend zu sein. Noxa dagegen wird für diesen Zelltod in den Melanomzellen offensichtlich benötigt. Nachdem bei der UO126/ABT-737-vermittelten Apoptose der Mcl-1-Abbau ein wesentliches Ereignis ist, und nur Noxa und nicht Bim die proteasomale Degradation von Mcl-1 bestimmen kann (Willis *et al.* 2005; Czabotar *et al.* 2007), ist die bedeutungsvolle Rolle von Noxa somit erklärbar.

Interessanterweise, abgesehen von der ebenfalls in den WT-Zellen beobachteten Dephosphorylierung von ERK, konnte eine Degradation von Mcl-1 in der Kontrollzelllinie ebenso wie nach Bim- oder Noxa-spezifischer RNAi nach MEK-Inhibition nachgewiesen werden (Abbildung 33). Eine genaue kinetische Untersuchung des Proteinspiegels von Mcl-1 nach der UO126-Stimulation ergab einen ähnlich raschen Mcl-1-Abbau in den Kontrollgenauso wie in den Noxa-KD-Zellen (Abbildung 34). Entweder spielt in diesen Melanomzellen bei der UO126-vermittelten Mcl-1-Degradation also noch ein anderer Faktor eine entscheidende Rolle, oder die Proteinspiegel von Noxa (die allerdings kaum detektierbar waren, wie in der Abbildung 33 sowie in der Abbildung 34 zu sehen ist) reichen trotz RNAi noch aus, um Mcl-1 abzubauen.

Allerdings war die UO126-intiierte Degradation von Mcl-1 Proteasom-abhängig. Der Proteasom-Inhibitor MG132 konnte den Mcl-1-Abbau blockieren und verursachte eine Akkumulierung dieses anti-apoptotischen Proteins (Abbildung 36). Nachdem Mcl-1 ein Protein mit rapidem Umsatz ist, wobei das Proteasom eine wichtige Rolle spielt (Hershko und Ciechanover 1998; Nijhawan *et al.* 2003), war das Ergebnis nicht unerwartet, zeigt

jedoch, dass der Verlust von Mcl-1 eher nicht auf eine Änderung der Proteinsynthese zurückzuführen ist.

Die Kinase GSK3 löste in IL-3-abhängigen Zellen durch die Phosphorylierung von Mcl-1, was folglich zu dessen Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau führt, Apoptose aus. Eine Blockierung der GSK3 mit dem Inhibitor CHIR-611 (in dieser Arbeit CT98014 genannt) führte zur Mcl-1-Stabilisierung und zur Inhibition der durch den IL-3-Entzug initiierten Apoptose (Maurer *et al.* 2006). Eine mögliche Rolle der GSK3 bei dem UO126-vermittelten Mcl-1-Abbau wurde deshalb untersucht. Überraschenderweise trug die Vorstimulation der Zellen mit dem GSK3-Inhibitor CT98014 zu einer erheblichen Erhöhung der UO126/ABT-737-vermittelten Apoptose in allen Melanomzelllinien bei. Vor allem die resistenteren Zelllinien WM35 und Sbcl2 wurden durch die GSK-Inhibition für die Kombination aus UO126 und ABT-737 gewaltig sensibilisiert (Abbildung 37).

Falls dieser Effekt Mcl-1-abhängig war, müsste die Blockierung von GSK3 mit CT98014 damit hier zur Neutralisation von Mcl-1 und nicht zu dessen Hochregulation führen. Dies würde zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt werden, dass die Kombination aus CT98014 und ABT-737 ebenfalls effizient Apoptose auslöste. Erstaunlicherweise wurde diese Vermutung auf der Proteinebene nicht bestätigt (Abbildung 38). Die Proteinspiegel nicht nur von Mcl-1, sondern auch von Noxa wurden nach CT98014-Stimulation leicht bis mäßig erhöht. Man muss hier natürlich erwähnen, dass die Behandlung mit CT98014 alleine keine Apoptose in den Melanomzellen auslöst. Außerdem resultiert die Kombination aus CT98014, ABT-737 und UO126 in keiner Hochregulation von Mcl-1 und zusätzlich in einer Reduktion des Noxa-Proteinspiegels im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abbildung 38).

Eine Erklärung der pro-apoptischen Eigenschaften von CT98014 in der Kombinationsbehandlung lässt sich eventuell aus der kinetischen Untersuchung ableiten. Während die Mcl-1-Proteinspiegel nach CT98014-Stimulation anfangs leicht gestiegen waren, fielen sie nach einer gewissen Zeit ab, was gleichzeitig mit dem Anstieg des Proteinniveaus von Noxa geschah (Abbildung 39). Das könnte bedeuten, dass die Blockierung der GSK3 in den Melanomzellen aus einer verzögerten Noxa-Hochregulation und daraus folgenden Reduktion des Mcl-1-Proteinspiegels resultiert.

In den untersuchten Melanomzellen scheint also die Inhibition von GSK3 pro-apoptische Folgen zu haben. Panka *et al.* haben gezeigt, dass die apoptogenen Eigenschaften des C- und BRAF-Inhibitors Sorafenib durch die Inhibition der GSK3 gefördert werden können (Panka *et al.* 2008). Andere berichteten über eine Aktivierung des p53-Signalweges und über eine darauf folgende Noxa-Hochregulation durch die Hemmung der GSK3 in humanen Melanomzelllinien (Smalley *et al.* 2007). Darüber hinaus potenzierte die GSK3-Inhibition die TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose vor allem in MYC-überexprimierenden Zelllinien (zwei



Kolonkrebszelllinien und eine immortalisierte aber nicht transformierte Nierenepithelzelllinie) (Rottmann *et al.* 2005).

Nachdem GSK3 Mcl-1 an der Serin 159 phosphoryliert, wäre es sicherlich interessant zusätzlich den Phosphorylierungsstatus von Mcl-1 zu überprüfen. Allerdings erfordert die GSK3-Phosphorylierung eine Initial-Phosphorylierung des Substrats (Fiol *et al.* 1987), die im Fall von Mcl-1 an der Threonin 163 stattfindet und von der MAP-Kinase ERK durchgeführt wird (Domina *et al.* 2004). Andere haben dagegen beschrieben, dass eine Vor-Phosphorylierung durch die Kinase JNK für die GSK3-vermittelte und zum Abbau führende Phosphorylierung von Mcl-1 benötigt wird (Morel *et al.* 2009). Eine Detektion des Phospho-Mcl-1 war hier leider nicht möglich. Der Antikörper gegen p-Mcl-1 detektierte im Western Blot nur eine Proteinbande, die sich auf der falschen Höhe befand. Außerdem nachdem verschiedene Mcl-1-Phosphorylierungsstellen unterschiedliche Funktionen haben (s. Kapitel 1.1.5.2 und 1.1.5.3), hätte eine Differenzierung zwischen den Phosphorylierungsformen von Mcl-1 gezeigt werden müssen. Dies wäre mit dem hier verwendeten Antikörper nicht machbar, da dieser beide Phosphoformen (p-S159 und p-S163) des Proteins erkennt. Zusätzlich zu den oben genannten Mcl-1-Phosphorylierungsereignissen wurde von einer weiteren ERK- sowie GSK3-unabhängigen Phosphorylierungsstelle an Serin 64 berichtet, welche die anti-apoptotische Funktion von Mcl-1 verstärken soll (Kobayashi *et al.* 2007). Andere Autoren wieder bezweifelten die Bedeutung der ERK-vermittelten Phosphorylierung von Mcl-1, da diese kaum detektierbar war und dafür eine stärkere JNK-abhängige Phosphorylierung an zwei Mcl-1-Aminosäureresten (Serin 121 und Threonin 163) nachgewiesen wurde. Diese resultierte in der Inaktivierung von Mcl-1 (Inoshita *et al.* 2002).

Für die UO126/ABT-737/CT98014-induzierte Apoptose wirkt weder die Abwesenheit von Noxa noch die von Bim schützend für die Melanomzellen (Abbildung 40). Lediglich bei ABT-737/CT98014-induziertem apoptotischen Zelltod scheint die Abwesenheit von Noxa eine schützende Funktion zu haben (Abbildung 40, unten im Bild)). Eine Reduktion der apoptotischen Zellpopulation in den Noxa-KD-Zellen war nach der Stimulation mit ABT-737 und UO126 sowie CT98014 und ABT-737 nachweisbar, nicht aber wenn mit allen drei Agenzien behandelt wurde. Demzufolge ist bei der Dreifach-Behandlung die Anwesenheit von Noxa für die erfolgreiche Apoptoseinduktion nicht notwendig. Man muss jedoch dazu sagen, dass dieser Effekt nicht sehr robust war und nur auf die PI-Färbung und weniger auf die Färbung der aktiven Caspase-3 zutrifft. Außerdem soll erwähnt werden, dass die durchflusszytometrischen Messungen aus der Abbildung 40 nur einmal durchgeführt wurden. Der Einfluss der UO126-, ABT-737- und CT98014-Stimulationen auf die KD-Melanomzellen war ähnlich wie im Fall der Mutterzellen. Die Dephosphorylierung von ERK und die Akkumulation von Bim<sub>EL</sub> wurden als Folgen der Stimulation mit UO126 nachgewiesen. Die CT98014-Behandlung verursachte dagegen keine Änderung des Bim-Proteinniveaus, dafür

aber regulierte sie die Proteinspiegel von Noxa leicht hoch. Somit scheint UO126 die Bim-Proteinspiegel zu steuern, während eine gewisse Kontrolle über Noxa bei GSK3 liegt. Interessanterweise zeigte sich dies bei allen KD-Zelllinien. Natürlich war im Fall von Noxa-KD-Zellen die CT98014-vermittelte Noxa-Hochregulation viel weniger stark ausgeprägt, genauso wie die UO126-bedingte Erhöhung des Proteinspiegels von Bim in den Bim-KD-Zellen im Vergleich zu den KD-Kontrollzellen auch deutlich kleiner ausfiel. Die Proteinspiegel von Mcl-1 wurden durch UO126 in den KD-Kontrollzellen reduziert und stiegen mit der Zugabe von CT98014 wieder etwas an.

Der Effekt von UO126 und CT98014 scheint im Großen und Ganzen der Gleiche zu sein. Beide Inhibitoren reduzieren letztlich die Mcl-1-Proteinspiegel. Es ist nicht ausgeschlossen, dass sie trotzdem verschiedene Mechanismen dazu verwenden. Zusätzlich besteht ein Unterschied zwischen den kinetischen Untersuchungen der Proteinspiegelreduktion von Mcl-1 durch CT98014 bzw. UO126. Während nach der Stimulation mit CT98014 Mcl-1-Proteinbande nach frühestens 16 h schwächer erschien (Abbildung 39), konnte eine deutliche Abnahme des Mcl-1-Proteinspiegels durch die Verwendung von UO126 bereits nach 3 h beobachtet werden (Abbildung 34 und Abbildung 35). Die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass die UO126-induzierte Mcl-1-Degradation zum größten Teil Noxa-unabhängig verläuft (Abbildung 34), allerdings ist die UO126/ABT-737-vermittelte Apoptose durch die Abwesenheit von Noxa teilweise blockierbar (Abbildung 32). Möglicherweise wird durch UO126 ein Noxa-unabhängiger Mechanismus der Mcl-1-Degradation aktiviert, der durch die Anwesenheit von Noxa nur verstärkt werden könnte. Die GSK3-Inhibition durch CT98014 scheint dagegen, zumindest auf Proteinebene, Noxa für den Mcl-1-Abbau zu verwenden, indem es dieses BH3-only Protein hochreguliert (Abbildung 38 und Abbildung 39). Zusätzlich hemmen die niedrigen Noxa-Proteinspiegel in den Noxa-KD-Zellen die CT98014/ABT-737-induzierte Apoptose effektiver als das bei dem UO126/ABT-737-vermittelten Zelltod der Fall ist (Abbildung 40, unten im Bild)). Das würde bedeuten, dass Noxa bei dem CT98014/ABT-737-induzierten apoptotischen Zelltod eine wichtigere Rolle spielt als bei der Stimulation mit UO126 und ABT-737.

Welche anderen Komponenten, die zur Mcl-1-Herunterregulation führen, könnten durch UO126 und CT98014 zusätzlich mobilisiert werden? Die E3-Ubiquitin-Ligase Mule soll für die Poly-Ubiquitinierung von Mcl-1 verantwortlich sein (Zhong *et al.* 2005). Allerdings kann Mule Mcl-1 nicht ubiquitinieren, wenn sich das anti-apoptotische Protein im Komplex mit Noxa befindet (diskutiert in (Ploner *et al.* 2009)). Dieser Fall tritt wahrscheinlich bei der CT98014/ABT-737-Behandlung auf.

Eine andere E3-Ubiquitin-Ligase SCF<sup>FBW7</sup> (*a SKP1-cullin-1-F-box complex that contains FBW7 as the F-box protein*) (Welcker und Clurman 2008), die Mcl-1-Poly-Ubiquitinierung und darauf folgende Degradation induzieren kann, wurde vor Kurzem als Apoptose-regulierender

Faktor in T-ALL(T-Zell akute lymphatische Leukämie)-Zellen beschrieben (Inuzuka *et al.* 2011). Die Zielerkennung von SCF<sup>FBW7</sup> erfolgt nach der GSK3-abhängigen Phosphorylierung von Mcl-1 (Inuzuka *et al.* 2011). Die Mcl-1-Degradation in aus Patienten gewonnenen Tumorzellen, die entweder Funktionsverlust-Mutationen oder die Abwesenheit des *FBW7*-Gens vorwies, war blockiert und erklärte somit die Resistenz dieser Zellen gegenüber Anti-Tubulin-Agenzien wie Taxol oder Vincristin (Wertz *et al.* 2011). Die genetische Rekonstitution von *FBW7* stellte außerdem die Sensitivität gegenüber ABT-737 wieder her (Inuzuka *et al.* 2011). Eine solche Testung wäre eventuell auch im Fall der hier verwendeten Melanomzelllinien interessant. Der genetische *FBW7*-Status der hier benutzen Zellen ist allerdings nicht bekannt. Eine mögliche Korrelation zwischen UO126 bzw. CT98014 und *FBW7* müsste weiter analysiert werden.

Die Deubiquitinase USP9X entfernt dagegen die Poly-Ubiquitin-Ketten von Mcl-1 und bewahrt somit das anti-apoptotische Protein vor seiner proteasomalen Degradation (Schwickart *et al.* 2010). Ob UO126 einen Einfluss auf die USP9X hat, bleibt ungeklärt. Der Nachweis des Expressionsspiegels der Ubiquitinase ist leider nicht gelungen. Allerdings haben die RNAi-Experimente angedeutet, dass USP9X -wenn herunterreguliert- die Melanomzellen (vor allem die Zelllinien 1205Lu und WM35) für ABT-737 sensibilisieren kann (vorläufige Daten, nicht gezeigt). Dies wurde ebenso für zwei Kolonkrebiszelllinien sowie eine T-Zell-Leukämie-Zelllinie (Schwickart *et al.* 2010), aber noch nicht für das maligne Melanom gezeigt. Demzufolge scheint die transiente Herunterregulation der Mcl-1-Deubiquitinase in den Melanomzellen ausreichend zu sein, um die Mcl-1-Proteinspiegel soweit zu reduzieren, dass die ABT-737-Monostimulation in den getesteten Zelllinien die Apoptose induziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Blockierung des MAPK-Signalweges in den Melanomzellen nicht ausreichend ist, um Apoptose auszulösen. Die Reduktion der Mcl-1-Proteinspiegel durch den MEK-Inhibitor UO126 hilft zusammen mit dem Bcl-2-Antagonist, alle anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie zu neutralisieren und somit Apoptose zu induzieren. Die Hemmung der GSK3 mit CT98014 resultiert in keiner Reduktion des UO126/ABT-737-vermittelten apoptotischen Zelltodes, sondern verstärkt die pro-apoptotische Aktivität der zwei erwähnten Agenzien. CT98014 reduziert die Proteinspiegel von Mcl-1 ebenfalls, wobei das BH3-only Protein Noxa durch seine erhöhte Expression eine wesentliche Rolle zu spielen scheint.

#### **4.4 Schlussbemerkungen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen eine hohe Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion durch eine Reihe von verschiedenen anti-neoplastischen Agenzien aufweisen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass von verschiedenen Patienten stammende Zelllinien mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf die getesteten Agenzien reagieren.

Während die Zelllinien 1205Lu und WM35 auf die Stimulation mit Dacarbazin bzw. Fotemustin und ABT-737 am empfindlichsten reagierten, schien die 451Lu-Zelllinie auf diese Kombinationsbehandlung sehr resistent zu sein. Dennoch konnte durch die Stimulation mit UO126 und ABT-737 eine massive Apoptoserate in diesen metastatischen Tumorzellen gemessen werden. Dafür führte die Stimulation mit Poly I:C und LBW242 in den Sbcl2- und WM35-Zellen zur der höchsten Apoptoseinduktion. Demzufolge konnte für jede Zelllinie ein Ansatz gefunden werden, der effizient Apoptose induziert. Dies zeigt, dass sich auch Tumore der gleichen histologischen Herkunft hinsichtlich Apoptoseresistenz zwischen Patienten stark unterscheiden können. Somit bietet eine molekulare Analyse des Tumors die Gelegenheit einer sozusagen „maßgeschneiderten“ Behandlung; vielleicht ist dies die Zukunft der Krebstherapie.

## 5 Literaturverzeichnis

Abdel-Malek, Z. A. (2010). "Development of alpha-Melanocortin Analogs for Melanoma Prevention and Targeting." Adv Exp Med Biol **681**: 126-32.

Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**(2): 423-32.

Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." Oncogene **26**(9): 1324-37.

Akiyama, T., P. Bouillet, T. Miyazaki, Y. Kadono, H. Chikuda, U. I. Chung, A. Fukuda, A. Hikita, H. Seto, T. Okada, T. Inaba, A. Sanjay, R. Baron, H. Kawaguchi, H. Oda, K. Nakamura, A. Strasser and S. Tanaka (2003). "Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim." EMBO J **22**(24): 6653-64.

Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley and A. R. Saltiel (1995). "PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo." J Biol Chem **270**(46): 27489-94.

Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall and S. Cowley (1994). "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1." EMBO J **13**(7): 1610-9.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.

Alfredsson, J., H. Puthalakath, H. Martin, A. Strasser and G. Nilsson (2005). "Proapoptotic Bcl-2 family member Bim is involved in the control of mast cell survival and is induced together with Bcl-XL upon IgE-receptor activation." Cell Death Differ **12**(2): 136-44.

Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski and A. Zychlinsky (1999). "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2." Science **285**(5428): 736-9.

Aliprantis, A. O., R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski and A. Zychlinsky (2000). "The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2." EMBO J **19**(13): 3325-36.

Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**(8): 917-21.

Anderson, K. V., L. Bokla and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product." Cell **42**(3): 791-8.

Anderson, K. V. and C. Nusslein-Volhard (1984). "Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA." Nature **311**(5983): 223-7.

Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J. J. Mermod, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul and J. C. Martinou (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2." Science **277**(5324): 370-2.

Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez and J. C. Martinou (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." J Biol Chem **276**(15): 11615-23.

Armstrong, B. K. and A. Kricger (2001). "The epidemiology of UV induced skin cancer." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 8-18.

Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.

Atkins, M. B., J. Hsu, S. Lee, G. I. Cohen, L. E. Flaherty, J. A. Sosman, V. K. Sondak and J. M. Kirkwood (2008). "Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group." J Clin Oncol **26**(35): 5748-54.

Bakhshi, A., J. P. Jensen, P. Goldman, J. J. Wright, O. W. McBride, A. L. Epstein and S. J. Korsmeyer (1985). "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18." Cell **41**(3): 899-906.

Balch, C. M., J. E. Gershenwald, S. J. Soong, J. F. Thompson, M. B. Atkins, D. R. Byrd, A. C. Buzaid, A. J. Cochran, D. G. Coit, S. Ding, A. M. Eggermont, K. T. Flaherty, P. A. Gimotty, J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. C. Mihm, Jr., D. L. Morton, M. I. Ross, A. J. Sober and V. K. Sondak (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." J Clin Oncol **27**(36): 6199-206.

Balmano, K. and S. J. Cook (2009). "Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway." Cell Death Differ **16**(3): 368-77.

Bauer, A., S. Kirschnek and G. Hacker (2007). "Inhibition of apoptosis can be accompanied by increased Bim levels in T lymphocytes and neutrophil granulocytes." Cell Death Differ **14**(9): 1714-6.

Bauer, A., A. Villunger, V. Labi, S. F. Fischer, A. Strasser, H. Wagner, R. M. Schmid and G. Hacker (2006). "The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(29): 10979-84.

Bell, J. K., J. Askins, P. R. Hall, D. R. Davies and D. M. Segal (2006). "The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8792-7.

Berking, C. (2005). "[The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma]." Hautarzt **56**(7): 687-96; quiz 697.

Berneburg, M. and C. Surber (2009). "Children and sun protection." Br J Dermatol **161** Suppl 3: 33-9.

Bertrand, M. J., S. Milutinovic, K. M. Dickson, W. C. Ho, A. Boudreault, J. Durkin, J. W. Gillard, J. B. Jaquith, S. J. Morris and P. A. Barker (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." Mol Cell **30**(6): 689-700.

- Birnbaum, M. J., R. J. Clem and L. K. Miller (1994). "An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs." J Virol **68**(4): 2521-8.
- Boisvert-Adamo, K., W. Longmate, E. V. Abel and A. E. Aplin (2009). "Mcl-1 is required for melanoma cell resistance to anoikis." Mol Cancer Res **7**(4): 549-56.
- Borden, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster and G. R. Stark (2007). "Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine." Nat Rev Drug Discov **6**(12): 975-90.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-9.
- Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams and A. Strasser (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**(5445): 1735-8.
- Bouillet, P., J. F. Purton, D. I. Godfrey, L. C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J. M. Adams and A. Strasser (2002). "BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes." Nature **415**(6874): 922-6.
- Brenner, M. and V. J. Hearing (2008). "The protective role of melanin against UV damage in human skin." Photochem Photobiol **84**(3): 539-49.
- Bunney, T. D. and M. Katan (2010). "Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN." Nat Rev Cancer **10**(5): 342-52.
- Buzaid, A. C. (2002). "Biochemotherapy for advanced melanoma." Crit Rev Oncol Hematol **44**(1): 103-8.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-21.
- Cartron, P. F., T. Gallenne, G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F. M. Vallette and P. Juin (2004). "The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA." Mol Cell **16**(5): 807-18.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong and A. Letai (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." Cancer Cell **9**(5): 351-65.
- Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri and Y. Shi (2001). "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." Cell **104**(5): 769-80.
- Chauhan, D., P. Neri, M. Velankar, K. Podar, T. Hideshima, M. Fulciniti, P. Tassone, N. Raje, C. Mitsiades, N. Mitsiades, P. Richardson, L. Zawel, M. Tran, N. Munshi and K. C. Anderson (2007). "Targeting mitochondrial factor Smac/DIABLO as therapy for multiple myeloma (MM)." Blood **109**(3): 1220-7.
- Chauhan, D., M. Velankar, M. Brahmandam, T. Hideshima, K. Podar, P. Richardson, R. Schlossman, I. Ghobrial, N. Raje, N. Munshi and K. C. Anderson (2007). "A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma." Oncogene **26**(16): 2374-80.

- Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams and D. C. Huang (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." Mol Cell **17**(3): 393-403.
- Chen, M. and J. Wang (2002). "Initiator caspases in apoptosis signaling pathways." Apoptosis **7**(4): 313-9.
- Chen, N. J., Chio, H., W. J. Lin, G. Duncan, H. Chau, D. Katz, H. L. Huang, K. A. Pike, Z. Hao, Y. W. Su, K. Yamamoto, R. F. de Pooter, J. C. Zuniga-Pflucker, A. Wakeham, W. C. Yeh and T. W. Mak (2008). "Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12429-34.
- Chen, S., Y. Dai, H. Harada, P. Dent and S. Grant (2007). "Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation." Cancer Res **67**(2): 782-91.
- Chen, S., Y. Dai, X. Y. Pei and S. Grant (2009). "Bim upregulation by histone deacetylase inhibitors mediates interactions with the Bcl-2 antagonist ABT-737: evidence for distinct roles for Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1." Mol Cell Biol **29**(23): 6149-69.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten and S. J. Korsmeyer (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." Mol Cell **8**(3): 705-11.
- Chetoui, N., K. Sylla, J. V. Gagnon-Houde, C. Alcaide-Loridan, D. Charron, R. Al-Daccak and F. Aoudjit (2008). "Down-regulation of mcl-1 by small interfering RNA sensitizes resistant melanoma cells to fas-mediated apoptosis." Mol Cancer Res **6**(1): 42-52.
- Cheung, H. H., S. Plenchette, C. J. Kern, D. J. Mahoney and R. G. Korneluk (2008). "The RING domain of cIAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways." Mol Biol Cell **19**(7): 2729-40.
- Chhajlani, V. and J. E. Wikberg (1992). "Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA." FEBS Lett **309**(3): 417-20.
- Chin, L. (2003). "The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man." Nat Rev Cancer **3**(8): 559-70.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes and D. R. Green (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." Cell Death Differ **13**(8): 1396-402.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" Trends Cell Biol **18**(4): 157-64.
- Chong, H., H. G. Vikis and K. L. Guan (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." Cell Signal **15**(5): 463-9.
- Chou, J. J., H. Li, G. S. Salvesen, J. Yuan and G. Wagner (1999). "Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling." Cell **96**(5): 615-24.



- Chudnovsky, Y., P. A. Khavari and A. E. Adams (2005). "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics." J Clin Invest **115**(4): 813-24.
- Clarke, P. G. and S. Clarke (1996). "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena." Anat Embryol (Berl) **193**(2): 81-99.
- Cleary, M. L., S. D. Smith and J. Sklar (1986). "Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation." Cell **47**(1): 19-28.
- Conze, D. B., L. Albert, D. A. Ferrick, D. V. Goeddel, W. C. Yeh, T. Mak and J. D. Ashwell (2005). "Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 in vivo." Mol Cell Biol **25**(8): 3348-56.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.
- Cory, S., D. C. Huang and J. M. Adams (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-607.
- Coultas, L. and A. Strasser (2003). "The role of the Bcl-2 protein family in cancer." Semin Cancer Biol **13**(2): 115-23.
- Cragg, M. S., E. S. Jansen, M. Cook, C. Harris, A. Strasser and C. L. Scott (2008). "Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic." J Clin Invest **118**(11): 3651-9.
- Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-74.
- Czabotar, P. E., E. F. Lee, M. F. van Delft, C. L. Day, B. J. Smith, D. C. Huang, W. D. Fairlie, M. G. Hinds and P. M. Colman (2007). "Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6217-22.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-19.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-54.
- Day, C. L., L. Chen, S. J. Richardson, P. J. Harrison, D. C. Huang and M. G. Hinds (2005). "Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands." J Biol Chem **280**(6): 4738-44.

De Trez, C., B. Pajak, M. Brait, N. Glaichenhaus, J. Urbain, M. Moser, G. Lauvau and E. Muraille (2005). "TLR4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN-beta, but not MyD88, regulate Escherichia coli-induced dendritic cell maturation and apoptosis in vivo." J Immunol **175**(2): 839-46.

Del Gaizo Moore, V., J. R. Brown, M. Certo, T. M. Love, C. D. Novina and A. Letai (2007). "Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737." J Clin Invest **117**(1): 112-21.

del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera and G. Nunez (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." Science **278**(5338): 687-9.

Denisov, A. Y., M. S. Madiraju, G. Chen, A. Khadir, P. Beauparlant, G. Attardo, G. C. Shore and K. Gehring (2003). "Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix." J Biol Chem **278**(23): 21124-8.

Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-7.

Dijkers, P. F., R. H. Medema, J. W. Lammers, L. Koenderman and P. J. Coffey (2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." Curr Biol **10**(19): 1201-4.

Domina, A. M., J. A. Vrana, M. A. Gregory, S. R. Hann and R. W. Craig (2004). "MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol." Oncogene **23**(31): 5301-15.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.

Du, H., J. Wolf, B. Schafer, T. Moldoveanu, J. E. Chipuk and T. Kuwana (2011). "BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak." J Biol Chem **286**(1): 491-501.

Duckett, C. S., F. Li, Y. Wang, K. J. Tomaselli, C. B. Thompson and R. C. Armstrong (1998). "Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c." Mol Cell Biol **18**(1): 608-15.

Duckett, C. S., V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. Van Dongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick and C. B. Thompson (1996). "A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors." EMBO J **15**(11): 2685-94.

Dudley, D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges and A. R. Saltiel (1995). "A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7686-9.

Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." J Biol Chem **281**(6): 3254-60.

Egle, A., A. W. Harris, P. Bouillet and S. Cory (2004). "Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6164-9.

- Eigentler, T. K., U. M. Caroli, P. Radny and C. Garbe (2003). "Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials." Lancet Oncol **4**(12): 748-59.
- Enders, A., P. Bouillet, H. Puthalakath, Y. Xu, D. M. Tarlinton and A. Strasser (2003). "Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells." J Exp Med **198**(7): 1119-26.
- Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." Nat Rev Cancer **9**(8): 550-62.
- Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-19.
- Erlacher, M., E. M. Michalak, P. N. Kelly, V. Labi, H. Niederegger, L. Coultas, J. M. Adams, A. Strasser and A. Villunger (2005). "BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo." Blood **106**(13): 4131-8.
- Ermolaeva, M. A., M. C. Michallet, N. Papadopoulou, O. Utermohlen, K. Kranidioti, G. Kollias, J. Tschopp and M. Pasparakis (2008). "Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses." Nat Immunol **9**(9): 1037-46.
- Falschlehner, C., C. H. Emmerich, B. Gerlach and H. Walczak (2007). "TRAIL signalling: decisions between life and death." Int J Biochem Cell Biol **39**(7-8): 1462-75.
- Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle and J. M. Trzaskos (1998). "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase." J Biol Chem **273**(29): 18623-32.
- Fernandez, Y., M. Verhaegen, T. P. Miller, J. L. Rush, P. Steiner, A. W. Opipari, Jr., S. W. Lowe and M. S. Soengas (2005). "Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications." Cancer Res **65**(14): 6294-304.
- Field, A. K., A. A. Tytell, G. P. Lampson and M. R. Hilleman (1967). "Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(3): 1004-10.
- Fiol, C. J., A. M. Mahrenholz, Y. Wang, R. W. Roeske and P. J. Roach (1987). "Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3." J Biol Chem **262**(29): 14042-8.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley and A. Toker (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." Science **275**(5300): 665-8.
- Fraser, A. G., C. James, G. I. Evan and M. O. Hengartner (1999). "Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis." Curr Biol **9**(6): 292-301.

- Friday, B. B. and A. A. Adjei (2008). "Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy." Clin Cancer Res **14**(2): 342-6.
- Fuse, N., K. Yasumoto, K. Takeda, S. Amae, M. Yoshizawa, T. Uono, K. Takahashi, M. Tamai, Y. Tomita, M. Tachibana and S. Shibahara (1999). "Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus." J Biochem **126**(6): 1043-51.
- Gaither, A., D. Porter, Y. Yao, J. Borawski, G. Yang, J. Donovan, D. Sage, J. Slisz, M. Tran, C. Straub, T. Ramsey, V. Iourgenko, A. Huang, Y. Chen, R. Schlegel, M. Labow, S. Fawell, W. R. Sellers and L. Zawel (2007). "A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling." Cancer Res **67**(24): 11493-8.
- Gantz, I., T. Yamada, T. Tashiro, Y. Konda, Y. Shimoto, H. Miwa and J. M. Trent (1994). "Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by Fluorescence in situ hybridization." Genomics **19**(2): 394-5.
- Garbe, C., T. K. Eigentler, U. Keilholz, A. Hauschild and J. M. Kirkwood (2011). "Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects." Oncologist **16**(1): 5-24.
- Garnett, M. J. and R. Marais (2004). "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene." Cancer Cell **6**(4): 313-9.
- Gay, N. J. and M. Gangloff (2007). "Structure and function of Toll receptors and their ligands." Annu Rev Biochem **76**: 141-65.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." Nature **351**(6325): 355-6.
- Geyer, M. and A. Wittinghofer (1997). "GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins." Curr Opin Struct Biol **7**(6): 786-92.
- Gloster, H. M., Jr. and K. Neal (2006). "Skin cancer in skin of color." J Am Acad Dermatol **55**(5): 741-60; quiz 761-4.
- Grad, J. M., X. R. Zeng and L. H. Boise (2000). "Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT." Curr Opin Oncol **12**(6): 543-9.
- Grant, S. (2008). "Cotargeting survival signaling pathways in cancer." J Clin Invest **118**(9): 3003-6.
- Griffiths, G. J., B. M. Corfe, P. Savory, S. Leech, M. D. Esposti, J. A. Hickman and C. Dive (2001). "Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak." Oncogene **20**(52): 7668-76.
- Griffiths, G. J., L. Dubrez, C. P. Morgan, N. A. Jones, J. Whitehouse, B. M. Corfe, C. Dive and J. A. Hickman (1999). "Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 903-14.

Grimm, S., B. Z. Stanger and P. Leder (1996). "RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10923-7.

Grumont, R. J., I. J. Rourke and S. Gerondakis (1999). "Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis." Genes Dev **13**(4): 400-11.

Gyrd-Hansen, M., M. Darding, M. Miasari, M. M. Santoro, L. Zender, W. Xue, T. Tenev, P. C. da Fonseca, M. Zvelebil, J. M. Bujnicki, S. Lowe, J. Silke and P. Meier (2008). "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis." Nat Cell Biol **10**(11): 1309-17.

Gyrd-Hansen, M. and P. Meier (2010). "IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer." Nat Rev Cancer **10**(8): 561-74.

Haase, R., C. J. Kirschning, A. Sing, P. Schrottner, K. Fukase, S. Kusumoto, H. Wagner, J. Heesemann and K. Ruckdeschel (2003). "A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages." J Immunol **171**(8): 4294-303.

Hacker, G. (2000). "The morphology of apoptosis." Cell Tissue Res **301**(1): 5-17.

Hacker, G., K. Suttner, H. Harada and S. Kirschnek (2006). "TLR-dependent Bim phosphorylation in macrophages is mediated by ERK and is connected to proteasomal degradation of the protein." Int Immunol **18**(12): 1749-57.

Hacker, G. and A. Weber (2007). "BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?" Arch Biochem Biophys **462**(2): 150-5.

Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann and M. Karin (2006). "Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6." Nature **439**(7073): 204-7.

Hagenbuchner, J., M. J. Ausserlechner, V. Porto, R. David, B. Meister, M. Bodner, A. Villunger, K. Geiger and P. Obexer (2010). "The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression." J Biol Chem **285**(10): 6904-12.

Hamasaki, A., F. Sendo, K. Nakayama, N. Ishida, I. Negishi and S. Hatakeyama (1998). "Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene." J Exp Med **188**(11): 1985-92.

Han, K. J., X. Su, L. G. Xu, L. H. Bin, J. Zhang and H. B. Shu (2004). "Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways." J Biol Chem **279**(15): 15652-61.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.

Hao, Z., G. S. Duncan, C. C. Chang, A. Elia, M. Fang, A. Wakeham, H. Okada, T. Calzascia, Y. Jang, A. You-Ten, W. C. Yeh, P. Ohashi, X. Wang and T. W. Mak (2005). "Specific

ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis." Cell **121**(4): 579-91.

Harada, H., B. Quearry, A. Ruiz-Vela and S. J. Korsmeyer (2004). "Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15313-7.

Hauck, P., B. H. Chao, J. Litz and G. W. Krystal (2009). "Alterations in the Noxa/Mcl-1 axis determine sensitivity of small cell lung cancer to the BH3 mimetic ABT-737." Mol Cancer Ther **8**(4): 883-92.

Hauser, H. P., M. Bardroff, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (1998). "A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors." J Cell Biol **141**(6): 1415-22.

Hausmann, G., L. A. O'Reilly, R. van Driel, J. G. Beaumont, A. Strasser, J. M. Adams and D. C. Huang (2000). "Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L)." J Cell Biol **149**(3): 623-34.

Hay, B. A., D. A. Wassarman and G. M. Rubin (1995). "Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death." Cell **83**(7): 1253-62.

Hemann, M. T., J. T. Zilfou, Z. Zhao, D. J. Burgess, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2004). "Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9333-8.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.

Hildeman, D. A., Y. Zhu, T. C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler and P. Murrack (2002). "Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim." Immunity **16**(6): 759-67.

Hinds, M. G., M. Lackmann, G. L. Skea, P. J. Harrison, D. C. Huang and C. L. Day (2003). "The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity." EMBO J **22**(7): 1497-507.

Hinds, M. G., R. S. Norton, D. L. Vaux and C. L. Day (1999). "Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat." Nat Struct Biol **6**(7): 648-51.

Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." Nature **424**(6950): 743-8.

Hoek, K. S., O. M. Eichhoff, N. C. Schlegel, U. Dobbeling, N. Kobert, L. Schaerer, S. Hemmi and R. Dummer (2008). "In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states." Cancer Res **68**(3): 650-6.

Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.

Hoshino, R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, S. Ari-i, H. Wada, J. Fujimoto and M. Kohno (1999). "Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors." Oncogene **18**(3): 813-22.

- Houben, R., C. S. Vetter-Kauczok, S. Ortmann, U. R. Rapp, E. B. Broecker and J. C. Becker (2008). "Phospho-ERK staining is a poor indicator of the mutational status of BRAF and NRAS in human melanoma." J Invest Dermatol **128**(8): 2003-12.
- Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan and D. V. Goeddel (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hsu, H., J. Xiong and D. V. Goeddel (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Hsu, Y. T., K. G. Wolter and R. J. Youle (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3668-72.
- Hsu, Y. T. and R. J. Youle (1998). "Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations." J Biol Chem **273**(17): 10777-83.
- Huang, B., J. Zhao, H. Li, K. L. He, Y. Chen, S. H. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless and H. Xiong (2005). "Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance." Cancer Res **65**(12): 5009-14.
- Huang, D. C., S. Cory and A. Strasser (1997). "Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death." Oncogene **14**(4): 405-14.
- Huang, Y., Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka and H. Wu (2001). "Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain." Cell **104**(5): 781-90.
- Hussein, M. R. (2005). "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms." J Cutan Pathol **32**(3): 191-205.
- Inoshita, S., K. Takeda, T. Hatai, Y. Terada, M. Sano, J. Hata, A. Umezawa and H. Ichijo (2002). "Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress." J Biol Chem **277**(46): 43730-4.
- Into, T., Y. Nodasaka, A. Hasebe, T. Okuzawa, J. Nakamura, N. Ohata and K. Shibata (2002). "Mycoplasmal lipoproteins induce toll-like receptor 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes." Microbiol Immunol **46**(4): 265-76.
- Inuzuka, H., S. Shaik, I. Onoyama, D. Gao, A. Tseng, R. S. Maser, B. Zhai, L. Wan, A. Gutierrez, A. W. Lau, Y. Xiao, A. L. Christie, J. Aster, J. Settleman, S. P. Gygi, A. L. Kung, T. Look, K. I. Nakayama, R. A. DePinho and W. Wei (2011). "SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction." Nature **471**(7336): 104-9.
- Irmiler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French and J. Tschopp (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-5.
- Jager, R., U. Herzer, J. Schenkel and H. Weiher (1997). "Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice." Oncogene **15**(15): 1787-95.

Jahrsdorfer, B., R. Jox, L. Muhlenhoff, K. Tschoep, A. Krug, S. Rothenfusser, G. Meinhardt, B. Emmerich, S. Endres and G. Hartmann (2002). "Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN." J Leukoc Biol **72**(1): 83-92.

Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.

Jansen, B., V. Wacheck, E. Heere-Ress, H. Schlagbauer-Wadl, C. Hoeller, T. Lucas, M. Hoermann, U. Hollenstein, K. Wolff and H. Pehamberger (2000). "Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy." Lancet **356**(9243): 1728-33.

Jeffers, J. R., E. Parganas, Y. Lee, C. Yang, J. Wang, J. Brennan, K. H. MacLean, J. Han, T. Chittenden, J. N. Ihle, P. J. McKinnon, J. L. Cleveland and G. P. Zambetti (2003). "Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways." Cancer Cell **4**(4): 321-8.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward (2010). "Cancer statistics, 2010." CA Cancer J Clin **60**(5): 277-300.

Jhappan, C., F. P. Noonan and G. Merlino (2003). "Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma." Oncogene **22**(20): 3099-112.

Jiang, Q., H. Wei and Z. Tian (2008). "Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway." BMC Cancer **8**: 12.

Jiang, Z., T. W. Mak, G. Sen and X. Li (2004). "Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3533-8.

Jiang, Z., M. Zamanian-Daryoush, H. Nie, A. M. Silva, B. R. Williams and X. Li (2003). "Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR." J Biol Chem **278**(19): 16713-9.

Johnstone, R. W., A. J. Frew and M. J. Smyth (2008). "The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy." Nat Rev Cancer **8**(10): 782-98.

Jones, R. G., M. Parsons, M. Bonnard, V. S. Chan, W. C. Yeh, J. R. Woodgett and P. S. Ohashi (2000). "Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo." J Exp Med **191**(10): 1721-34.

Jun, T., O. Gjoerup and T. M. Roberts (1999). "Tangled webs: evidence of cross-talk between c-Raf-1 and Akt." Sci STKE **1999**(13): PE1.

Kaina, B., M. Christmann, S. Naumann and W. P. Roos (2007). "MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents." DNA Repair (Amst) **6**(8): 1079-99.



- Kaiser, W. J. and M. K. Offermann (2005). "Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif." J Immunol **174**(8): 4942-52.
- Kalali, B. N., G. Kollisch, J. Mages, T. Muller, S. Bauer, H. Wagner, J. Ring, R. Lang, M. Mempel and M. Ollert (2008). "Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling." J Immunol **181**(4): 2694-704.
- Kamijo, T., J. D. Weber, G. Zambetti, F. Zindy, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1998). "Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8292-7.
- Kang, M. H., Y. H. Kang, B. Szymanska, U. Wilczynska-Kalak, M. A. Sheard, T. M. Harned, R. B. Lock and C. P. Reynolds (2007). "Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo." Blood **110**(6): 2057-66.
- Kang, M. H. and C. P. Reynolds (2009). "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy." Clin Cancer Res **15**(4): 1126-32.
- Karst, A. M., D. L. Dai, M. Martinka and G. Li (2005). "PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas." Oncogene **24**(6): 1111-6.
- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- Katso, R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms and M. D. Waterfield (2001). "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 615-75.
- Kaufmann, T., L. Tai, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Norris, R. K. Lindemann, R. W. Johnstone, V. M. Dixit and A. Strasser (2007). "The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest." Cell **129**(2): 423-33.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, H. C. Tu, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh and E. H. Cheng (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." Nat Cell Biol **8**(12): 1348-58.
- Kirkwood, J. M., R. Gonzalez, D. Reintgen, P. R. Clingan, R. R. McWilliams, D. P. de Alwis, A. Zimmermann, M. P. Brown, R. L. Ilaria, Jr. and M. J. Millward (2011). "A phase 2 study of tasisulam sodium (LY573636 sodium) as second-line treatment for patients with unresectable or metastatic melanoma." Cancer.
- Kirschnek, S., S. Ying, S. F. Fischer, H. Hacker, A. Villunger, H. Hochrein and G. Hacker (2005). "Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim." J Immunol **174**(2): 671-9.

Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO J **14**(22): 5579-88.

Kline, M. P., S. V. Rajkumar, M. M. Timm, T. K. Kimlinger, J. L. Haug, J. A. Lust, P. R. Greipp and S. Kumar (2007). "ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells." Leukemia **21**(7): 1549-60.

Klippel, A., W. M. Kavanaugh, D. Pot and L. T. Williams (1997). "A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain." Mol Cell Biol **17**(1): 338-44.

Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green and D. D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-6.

Knudson, C. M., K. S. Tung, W. G. Tourtellotte, G. A. Brown and S. J. Korsmeyer (1995). "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." Science **270**(5233): 96-9.

Ko, J. M. and D. E. Fisher (2011). "A new era: melanoma genetics and therapeutics." J Pathol **223**(2): 241-50.

Kobayashi, S., S. H. Lee, X. W. Meng, J. L. Mott, S. F. Bronk, N. W. Werneburg, R. W. Craig, S. H. Kaufmann and G. J. Gores (2007). "Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1." J Biol Chem **282**(25): 18407-17.

Kobe, B. and J. Deisenhofer (1995). "Proteins with leucine-rich repeats." Curr Opin Struct Biol **5**(3): 409-16.

Kohl, T. M., C. Hellinger, F. Ahmed, C. Buske, W. Hiddemann, S. K. Bohlander and K. Spiekermann (2007). "BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts." Leukemia **21**(8): 1763-72.

Konopleva, M., R. Contractor, T. Tsao, I. Samudio, P. P. Ruvolo, S. Kitada, X. Deng, D. Zhai, Y. X. Shi, T. Sneed, M. Verhaegen, M. Soengas, V. R. Ruvolo, T. McQueen, W. D. Schober, J. C. Watt, T. Jiffar, X. Ling, F. C. Marini, D. Harris, M. Dietrich, Z. Estrov, J. McCubrey, W. S. May, J. C. Reed and M. Andreeff (2006). "Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia." Cancer Cell **10**(5): 375-88.

Kreuz, S., D. Siegmund, J. J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich and H. Wajant (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." J Cell Biol **166**(3): 369-80.

Kumar, R., S. Angelini, E. Snellman and K. Hemminki (2004). "BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi." J Invest Dermatol **122**(2): 342-8.

Kuphal, S. and A. Bosserhoff (2009). "Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma." J Pathol **219**(4): 400-9.

- Kuroda, J., S. Kimura, A. Strasser, M. Andreeff, L. A. O'Reilly, E. Ashihara, Y. Kamitsuji, A. Yokota, E. Kawata, M. Takeuchi, R. Tanaka, Y. Tabe, M. Taniwaki and T. Maekawa (2007). "Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia." Cell Death Differ **14**(9): 1667-77.
- Kuroda, J., H. Puthalakath, M. S. Cragg, P. N. Kelly, P. Bouillet, D. C. Huang, S. Kimura, O. G. Ottmann, B. J. Druker, A. Villunger, A. W. Roberts and A. Strasser (2006). "Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(40): 14907-12.
- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green and D. D. Newmeyer (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." Mol Cell **17**(4): 525-35.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneiter, D. R. Green and D. D. Newmeyer (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-42.
- LaCasse, E. C., D. J. Mahoney, H. H. Cheung, S. Plenchette, S. Baird and R. G. Korneluk (2008). "IAP-targeted therapies for cancer." Oncogene **27**(48): 6252-75.
- Lee, E. F., P. E. Czabotar, B. J. Smith, K. Deshayes, K. Zobel, P. M. Colman and W. D. Fairlie (2007). "Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family." Cell Death Differ **14**(9): 1711-3.
- Lee, E. F., P. E. Czabotar, M. F. van Delft, E. M. Michalak, M. J. Boyle, S. N. Willis, H. Puthalakath, P. Bouillet, P. M. Colman, D. C. Huang and W. D. Fairlie (2008). "A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation." J Cell Biol **180**(2): 341-55.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2432-7.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-34.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler and S. J. Korsmeyer (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-92.
- Ley, R., K. Balmanno, K. Hadfield, C. Weston and S. J. Cook (2003). "Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim." J Biol Chem **278**(21): 18811-6.
- Ley, R., K. E. Ewings, K. Hadfield and S. J. Cook (2005). "Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK." Cell Death Differ **12**(8): 1008-14.
- Ley, R., K. E. Ewings, K. Hadfield, E. Howes, K. Balmanno and S. J. Cook (2004). "Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover." J Biol Chem **279**(10): 8837-47.

- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliareisis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler and R. Parsons (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." Science **275**(5308): 1943-7.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Lin, X., S. Morgan-Lappe, X. Huang, L. Li, D. M. Zakula, L. A. Verneti, S. W. Fesik and Y. Shen (2007). "'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737." Oncogene **26**(27): 3972-9.
- Lindsten, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-99.
- Linos, E., S. M. Swetter, M. G. Cockburn, G. A. Colditz and C. A. Clarke (2009). "Increasing burden of melanoma in the United States." J Invest Dermatol **129**(7): 1666-74.
- Liston, P., N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. Cherton-Horvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie and R. G. Korneluk (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." Nature **379**(6563): 349-53.
- Lithgow, T., R. van Driel, J. F. Bertram and A. Strasser (1994). "The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane." Cell Growth Differ **5**(4): 411-7.
- Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts and J. J. Zhao (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." Nat Rev Drug Discov **8**(8): 627-44.
- Liu, X., S. Dai, Y. Zhu, P. Marrack and J. W. Kappler (2003). "The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function." Immunity **19**(3): 341-52.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**(1): 147-57.
- Liu, Z., C. Sun, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. F. Betz, T. Oost, J. Herrmann, J. C. Wu and S. W. Fesik (2000). "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain." Nature **408**(6815): 1004-8.
- Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). "Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth." J Insect Physiol **11**: 123-33.
- Lopez, J., S. W. John, T. Tenev, G. J. Rautureau, M. G. Hinds, F. Francalanci, R. Wilson, M. Broemer, M. M. Santoro, C. L. Day and P. Meier (2011). "CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration." Mol Cell **42**(5): 569-83.

- Lopez, M., L. M. Sly, Y. Luu, D. Young, H. Cooper and N. E. Reiner (2003). "The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2." J Immunol **170**(5): 2409-16.
- Lovell, J. F., L. P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber and D. W. Andrews (2008). "Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax." Cell **135**(6): 1074-84.
- Lu, M., S. C. Lin, Y. Huang, Y. J. Kang, R. Rich, Y. C. Lo, D. Myszka, J. Han and H. Wu (2007). "XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization." Mol Cell **26**(5): 689-702.
- Luciano, F., A. Jacquet, P. Colosetti, M. Herrant, S. Cagnol, G. Pages and P. Auberger (2003). "Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function." Oncogene **22**(43): 6785-93.
- Mace, P. D., S. Shirley and C. L. Day (2010). "Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins." Cell Death Differ **17**(1): 46-53.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." J Biol Chem **273**(22): 13375-8.
- Marani, M., T. Tenev, D. Hancock, J. Downward and N. R. Lemoine (2002). "Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis." Mol Cell Biol **22**(11): 3577-89.
- Marchesi, F., M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino and L. De Vecchis (2007). "Triazine compounds: mechanism of action and related DNA repair systems." Pharmacol Res **56**(4): 275-87.
- Mason, K. D., M. R. Carpinelli, J. I. Fletcher, J. E. Collinge, A. A. Hilton, S. Ellis, P. N. Kelly, P. G. Ekert, D. Metcalf, A. W. Roberts, D. C. Huang and B. T. Kile (2007). "Programmed anuclear cell death delimits platelet life span." Cell **128**(6): 1173-86.
- Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto and T. Seya (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." J Immunol **171**(6): 3154-62.
- Maurer, U., C. Charvet, A. S. Wagman, E. Dejardin and D. R. Green (2006). "Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1." Mol Cell **21**(6): 749-60.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli and R. A. Franklin (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1263-84.
- McDonnell, J. M., D. Fushman, C. L. Milliman, S. J. Korsmeyer and D. Cowburn (1999). "Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists." Cell **96**(5): 625-34.
- McGill, G. G., M. Horstmann, H. R. Widlund, J. Du, G. Motyckova, E. K. Nishimura, Y. L. Lin, S. Ramaswamy, W. Avery, H. F. Ding, S. A. Jordan, I. J. Jackson, S. J. Korsmeyer, T. R.

- Golub and D. E. Fisher (2002). "Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability." Cell **109**(6): 707-18.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher and J. Tschopp (2004). "RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation." Nat Immunol **5**(5): 503-7.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Mikhailov, V., M. Mikhailova, D. J. Pulkrabek, Z. Dong, M. A. Venkatachalam and P. Saikumar (2001). "Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem **276**(21): 18361-74.
- Miller, L. A., N. B. Goldstein, W. U. Johannes, C. H. Walton, M. Fujita, D. A. Norris and Y. G. Shellman (2009). "BH3 mimetic ABT-737 and a proteasome inhibitor synergistically kill melanomas through Noxa-dependent apoptosis." J Invest Dermatol **129**(4): 964-71.
- Minn, A. J., P. Velez, S. L. Schendel, H. Liang, S. W. Muchmore, S. W. Fesik, M. Fill and C. B. Thompson (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." Nature **385**(6614): 353-7.
- Moldoveanu, T., Q. Liu, A. Tocilj, M. Watson, G. Shore and K. Gehring (2006). "The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site." Mol Cell **24**(5): 677-88.
- Mora, A., D. Komander, D. M. van Aalten and D. R. Alessi (2004). "PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 161-70.
- Morel, C., S. M. Carlson, F. M. White and R. J. Davis (2009). "Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis." Mol Cell Biol **29**(14): 3845-52.
- Motoyama, N., F. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, S. Fujii and et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice." Science **267**(5203): 1506-10.
- Muchmore, S. W., M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettesheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S. L. Wong, S. L. Ng and S. W. Fesik (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." Nature **381**(6580): 335-41.
- Naik, E., E. M. Michalak, A. Villunger, J. M. Adams and A. Strasser (2007). "Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa." J Cell Biol **176**(4): 415-24.
- Naik, P., J. Karrim and D. Hanahan (1996). "The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors." Genes Dev **10**(17): 2105-16.

Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**(3): 683-94.

Narayanan, D. L., R. N. Saladi and J. L. Fox (2010). "Ultraviolet radiation and skin cancer." Int J Dermatol **49**(9): 978-86.

Nechushtan, A., C. L. Smith, I. Lamensdorf, S. H. Yoon and R. J. Youle (2001). "Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis." J Cell Biol **153**(6): 1265-76.

Newmeyer, D. D. and S. Ferguson-Miller (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death." Cell **112**(4): 481-90.

Nguyen, M., D. G. Millar, V. W. Yong, S. J. Korsmeyer and G. C. Shore (1993). "Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence." J Biol Chem **268**(34): 25265-8.

Nijhawan, D., M. Fang, E. Traer, Q. Zhong, W. Gao, F. Du and X. Wang (2003). "Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation." Genes Dev **17**(12): 1475-86.

Nishiya, T. and A. L. DeFranco (2004). "Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors." J Biol Chem **279**(18): 19008-17.

Nishiya, T., E. Kajita, S. Miwa and A. L. Defranco (2005). "TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements." J Biol Chem **280**(44): 37107-17.

O'Connor, L., A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory and D. C. Huang (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." EMBO J **17**(2): 384-95.

O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.

Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi and N. Tanaka (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-8.

Okumura, K., S. Huang and F. A. Sinicrope (2008). "Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737." Clin Cancer Res **14**(24): 8132-42.

Oliveira, R. B., M. T. Ochoa, P. A. Sieling, T. H. Rea, A. Rambukkana, E. N. Sarno and R. L. Modlin (2003). "Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy." Infect Immun **71**(3): 1427-33.

Oltersdorf, T., S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettekheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik and S. H. Rosenberg (2005). "An

inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." Nature **435**(7042): 677-81.

Ortonne, J. P. (2002). "Photoprotective properties of skin melanin." Br J Dermatol **146 Suppl 61**: 7-10.

Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa and T. Seya (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.

Panka, D. J., D. C. Cho, M. B. Atkins and J. W. Mier (2008). "GSK-3beta inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines." J Biol Chem **283**(2): 726-32.

Park, S. M., J. B. Yoon and T. H. Lee (2004). "Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro." FEBS Lett **566**(1-3): 151-6.

Paschen, S. A., A. Weber and G. Hacker (2007). "Mitochondrial protein import: a matter of death?" Cell Cycle **6**(20): 2434-9.

Passagne, I., A. Evrard, J. Y. Winum, P. Depeille, P. Cuq, J. L. Montero, D. Cupissol and L. Vian (2003). "Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by new fotemustine analogs on human melanoma cells in relation to O6-methylguanine DNA-methyltransferase expression." J Pharmacol Exp Ther **307**(2): 816-23.

Pelengaris, S., M. Khan and G. I. Evan (2002). "Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression." Cell **109**(3): 321-34.

Pellegrini, M., G. Belz, P. Bouillet and A. Strasser (2003). "Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14175-80.

Perrot, I., F. Deauvieau, C. Massacrier, N. Hughes, P. Garrone, I. Durand, O. Demaria, N. Viaud, L. Gauthier, M. Blery, N. Bonnefoy-Berard, Y. Morel, J. Tschopp, L. Alexopoulou, G. Trinchieri, C. Paturel and C. Caux (2010). "TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA." J Immunol **185**(4): 2080-8.

Petersen, S. L., L. Wang, A. Yalcin-Chin, L. Li, M. Peyton, J. Minna, P. Harran and X. Wang (2007). "Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis." Cancer Cell **12**(5): 445-56.

Petros, A. M., A. Medek, D. G. Nettesheim, D. H. Kim, H. S. Yoon, K. Swift, E. D. Matayoshi, T. Oltersdorf and S. W. Fesik (2001). "Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3012-7.

Petros, A. M., D. G. Nettesheim, Y. Wang, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, J. Mack, K. Swift, E. D. Matayoshi, H. Zhang, C. B. Thompson and S. W. Fesik (2000). "Rationale for



Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies." Protein Sci **9**(12): 2528-34.

Pisegna, S., G. Pirozzi, M. Piccoli, L. Frati, A. Santoni and G. Palmieri (2004). "p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells." Blood **104**(13): 4157-64.

Ploner, C., J. Rainer, S. Lobenwein, S. Geley and R. Kofler (2009). "Repression of the BH3-only molecule PMAIP1/Noxa impairs glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells." Apoptosis **14**(6): 821-8.

Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.

Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlow, H. W. Lee, C. Cordon-Cardo and R. A. DePinho (1998). "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." Cell **92**(6): 713-23.

Preston, D. S. and R. S. Stern (1992). "Nonmelanoma cancers of the skin." N Engl J Med **327**(23): 1649-62.

Print, C. G., K. L. Loveland, L. Gibson, T. Meehan, A. Stylianou, N. Wreford, D. de Kretser, D. Metcalf, F. Kontgen, J. M. Adams and S. Cory (1998). "Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12424-31.

Pugazhenthii, S., A. Nesterova, C. Sable, K. A. Heidenreich, L. M. Boxer, L. E. Heasley and J. E. Reusch (2000). "Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein." J Biol Chem **275**(15): 10761-6.

Putcha, G. V., S. Le, S. Frank, C. G. Besirli, K. Clark, B. Chu, S. Alix, R. J. Youle, A. LaMarche, A. C. Maroney and E. M. Johnson, Jr. (2003). "JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis." Neuron **38**(6): 899-914.

Putcha, G. V., K. L. Moulder, J. P. Golden, P. Bouillet, J. A. Adams, A. Strasser and E. M. Johnson (2001). "Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis." Neuron **29**(3): 615-28.

Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King and A. Strasser (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell **3**(3): 287-96.

Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P. N. Kelly, N. D. Huntington, P. D. Hughes, E. M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet and A. Strasser (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." Cell **129**(7): 1337-49.

Puthalakath, H., A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang and A. Strasser (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." Science **293**(5536): 1829-32.

- Qi, X. J., G. M. Wildey and P. H. Howe (2006). "Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function." J Biol Chem **281**(2): 813-23.
- Qin, J. Z., J. Ziffra, L. Stennett, B. Bodner, B. K. Bonish, V. Chaturvedi, F. Bennett, P. M. Pollock, J. M. Trent, M. J. Hendrix, P. Rizzo, L. Miele and B. J. Nickoloff (2005). "Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells." Cancer Res **65**(14): 6282-93.
- Quelle, D. E., F. Zindy, R. A. Ashmun and C. J. Sherr (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." Cell **83**(6): 993-1000.
- Rampino, N., H. Yamamoto, Y. Ionov, Y. Li, H. Sawai, J. C. Reed and M. Perucho (1997). "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype." Science **275**(5302): 967-9.
- Rasschaert, J., L. Ladriere, M. Urbain, Z. Dogusan, B. Katabua, S. Sato, S. Akira, C. Gysemans, C. Mathieu and D. L. Eizirik (2005). "Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells." J Biol Chem **280**(40): 33984-91.
- Richter, B. W., S. S. Mir, L. J. Eiben, J. Lewis, S. B. Reffey, A. Frattini, L. Tian, S. Frank, R. J. Youle, D. L. Nelson, L. D. Notarangelo, P. Vezzoni, H. O. Fearnhead and C. S. Duckett (2001). "Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family." Mol Cell Biol **21**(13): 4292-301.
- Riedl, S. J., M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S. W. Fesik, R. C. Liddington and G. S. Salvesen (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." Cell **104**(5): 791-800.
- Rinkenberger, J. L., S. Horning, B. Klocke, K. Roth and S. J. Korsmeyer (2000). "Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality." Genes Dev **14**(1): 23-7.
- Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein and J. F. Bazan (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 588-93.
- Rothe, M., M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres and D. V. Goeddel (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." Cell **83**(7): 1243-52.
- Rottmann, S., Y. Wang, M. Nasoff, Q. L. Deveraux and K. C. Quon (2005). "A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15195-200.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-44.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." EMBO J **16**(23): 6914-25.
- Roy, N., M. S. Mahadevan, M. McLean, G. Shutler, Z. Yaraghi, R. Farahani, S. Baird, A. Besner-Johnston, C. Lefebvre, X. Kang and et al. (1995). "The gene for neuronal apoptosis

inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy." Cell **80**(1): 167-78.

Ruckdeschel, K., O. Mannel and P. Schrottner (2002). "Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members." J Immunol **168**(9): 4601-11.

Ruckdeschel, K., G. Pfaffinger, R. Haase, A. Sing, H. Weighardt, G. Hacker, B. Holzmann and J. Heesemann (2004). "Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages." J Immunol **173**(5): 3320-8.

Salaun, B., I. Coste, M. C. Rissoan, S. J. Lebecque and T. Renno (2006). "TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells." J Immunol **176**(8): 4894-901.

Salaun, B., S. Lebecque, S. Matikainen, D. Rimoldi and P. Romero (2007). "Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy?" Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4565-74.

Salaun, B., L. Zitvogel, C. Asselin-Paturel, Y. Morel, K. Chemin, C. Dubois, C. Massacrier, R. Conforti, M. P. Chenard, J. C. Sabourin, A. Goubar, S. Lebecque, M. Pierres, D. Rimoldi, P. Romero and F. Andre (2011). "TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer." Cancer Res **71**(5): 1607-14.

Saldanha, G., D. Purnell, A. Fletcher, L. Potter, A. Gillies and J. H. Pringle (2004). "High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types." Int J Cancer **111**(5): 705-10.

Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-10.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-101.

Sarkar, S. N., K. L. Peters, C. P. Elco, S. Sakamoto, S. Pal and G. C. Sen (2004). "Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling." Nat Struct Mol Biol **11**(11): 1060-7.

Sarna, T. (1992). "Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view." J Photochem Photobiol B **12**(3): 215-58.

Sasaki, T., S. Takasuga, J. Sasaki, S. Kofuji, S. Eguchi, M. Yamazaki and A. Suzuki (2009). "Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases." Prog Lipid Res **48**(6): 307-43.

Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda and S. Akira (2003). "Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **171**(8): 4304-10.

Sattler, M., H. Liang, D. Nettlesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson and S. W. Fesik (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." Science **275**(5302): 983-6.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer and M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." EMBO J **17**(6): 1675-87.

Schmelzle, T., A. A. Mailloux, M. Overholtzer, J. S. Carroll, N. L. Solimini, E. S. Lightcap, O. P. Veiby and J. S. Brugge (2007). "Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3787-92.

Schroder, M. and A. G. Bowie (2005). "TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander?" Trends Immunol **26**(9): 462-8.

Schwickart, M., X. Huang, J. R. Lill, J. Liu, R. Ferrando, D. M. French, H. Maecker, K. O'Rourke, F. Bazan, J. Eastham-Anderson, P. Yue, D. Dornan, D. C. Huang and V. M. Dixit (2010). "Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival." Nature **463**(7277): 103-7.

Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-7.

Sharma, S. K., C. Straub and L. Zawel (2006). "Development of Peptidomimetics Targeting IAPs." Int J Pept Res Ther **12**(1): 21-32.

Shi, Y. (2006). "Mechanical aspects of apoptosome assembly." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 677-84.

Shibata, M. A., M. L. Liu, M. C. Knudson, E. Shibata, K. Yoshidome, T. Bandey, S. J. Korsmeyer and J. E. Green (1999). "Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage." EMBO J **18**(10): 2692-701.

Shibue, T., K. Takeda, E. Oda, H. Tanaka, H. Murasawa, A. Takaoka, Y. Morishita, S. Akira, T. Taniguchi and N. Tanaka (2003). "Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response." Genes Dev **17**(18): 2233-8.

Shuker, S. B., P. J. Hajduk, R. P. Meadows and S. W. Fesik (1996). "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." Science **274**(5292): 1531-4.

Silke, J., T. Kratina, D. Chu, P. G. Ekert, C. L. Day, M. Pakusch, D. C. Huang and D. L. Vaux (2005). "Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16182-7.

Smalley, K. S., R. Contractor, N. K. Haass, A. N. Kulp, G. E. Atilla-Gokcumen, D. S. Williams, H. Bregman, K. T. Flaherty, M. S. Soengas, E. Meggers and M. Herlyn (2007). "An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells." Cancer Res **67**(1): 209-17.

Smalley, K. S., N. K. Haass, P. A. Brafford, M. Lioni, K. T. Flaherty and M. Herlyn (2006). "Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases." Mol Cancer Ther **5**(5): 1136-44.

Solit, D. B., L. A. Garraway, C. A. Pratilas, A. Sawai, G. Getz, A. Basso, Q. Ye, J. M. Lobo, Y. She, I. Osman, T. R. Golub, J. Sebolt-Leopold, W. R. Sellers and N. Rosen (2006). "BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition." Nature **439**(7074): 358-62.

Song, J., S. Salek-Ardakani, P. R. Rogers, M. Cheng, L. Van Parijs and M. Croft (2004). "The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity." Nat Immunol **5**(2): 150-8.

Srinivasula, S. M. and J. D. Ashwell (2008). "IAPs: what's in a name?" Mol Cell **30**(2): 123-35.

Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering and R. H. Medema (2002). "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2." J Immunol **168**(10): 5024-31.

Steck, P. A., M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. Teng and S. V. Tavtigian (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." Nat Genet **15**(4): 356-62.

Stott, F. J., S. Bates, M. C. James, B. B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, K. Ryan, E. Hara, K. H. Vousden and G. Peters (1998). "The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2." EMBO J **17**(17): 5001-14.

Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.

Strasser, A., A. W. Harris, M. L. Bath and S. Cory (1990). "Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2." Nature **348**(6299): 331-3.

Strasser, A., P. J. Jost and S. Nagata (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity **30**(2): 180-92.

Sun, C., M. Cai, A. H. Gunasekera, R. P. Meadows, H. Wang, J. Chen, H. Zhang, W. Wu, N. Xu, S. C. Ng and S. W. Fesik (1999). "NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP." Nature **401**(6755): 818-22.

Sun, R., Y. Zhang, Q. Lv, B. Liu, M. Jin, W. Zhang, Q. He, M. Deng, X. Liu, G. Li, Y. Li, G. Zhou, P. Xie, X. Xie, Z. Duan and J. Hu (2011). "Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform {alpha} (tap63{alpha})." J Biol Chem.

Sun, Y. and D. W. Leaman (2005). "Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection." J Biol Chem **280**(16): 15561-8.

Suzuki, M., R. J. Youle and N. Tjandra (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-54.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-21.

- Tahir, S. K., X. Yang, M. G. Anderson, S. E. Morgan-Lappe, A. V. Sarthy, J. Chen, R. B. Warner, S. C. Ng, S. W. Fesik, S. W. Elmore, S. H. Rosenberg and C. Tse (2007). "Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737." Cancer Res **67**(3): 1176-83.
- Tamm, I., S. M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D. A. Scudiero, G. Tudor, Y. H. Qui, A. Monks, M. Andreeff and J. C. Reed (2000). "Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias." Clin Cancer Res **6**(5): 1796-803.
- Tan, T. T., K. Degenhardt, D. A. Nelson, B. Beaudoin, W. Nieves-Neira, P. Bouillet, A. Villunger, J. M. Adams and E. White (2005). "Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy." Cancer Cell **7**(3): 227-38.
- Tarhini, A. A. and S. S. Agarwala (2006). "Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease." Dermatol Ther **19**(1): 19-25.
- Tenev, T., A. Zachariou, R. Wilson, A. Paul and P. Meier (2002). "Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1." EMBO J **21**(19): 5118-29.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman and D. W. Nicholson (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." J Biol Chem **272**(29): 17907-11.
- Tse, C., A. R. Shoemaker, J. Adickes, M. G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E. F. Johnson, K. C. Marsh, M. J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S. K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S. H. Rosenberg and S. W. Elmore (2008). "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor." Cancer Res **68**(9): 3421-8.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe and C. M. Croce (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-3.
- Tuveson, D. A., B. L. Weber and M. Herlyn (2003). "BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies." Cancer Cell **4**(2): 95-8.
- Ui-Tei, K., Y. Naito, F. Takahashi, T. Haraguchi, H. Ohki-Hamazaki, A. Juni, R. Ueda and K. Saigo (2004). "Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference." Nucleic Acids Res **32**(3): 936-48.
- Uong, A. and L. I. Zon (2010). "Melanocytes in development and cancer." J Cell Physiol **222**(1): 38-41.
- Uren, A. G., T. Beilharz, M. J. O'Connell, S. J. Bugg, R. van Driel, D. L. Vaux and T. Lithgow (1999). "Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10170-5.

- Uren, A. G., M. Pakusch, C. J. Hawkins, K. L. Puls and D. L. Vaux (1996). "Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4974-8.
- Uren, R. T., G. Dewson, L. Chen, S. C. Coyne, D. C. Huang, J. M. Adams and R. M. Kluck (2007). "Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak." J Cell Biol **177**(2): 277-87.
- Vallabhapurapu, S., A. Matsuzawa, W. Zhang, P. H. Tseng, J. J. Keats, H. Wang, D. A. Vignali, P. L. Bergsagel and M. Karin (2008). "Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling." Nat Immunol **9**(12): 1364-70.
- van Delft, M. F., A. H. Wei, K. D. Mason, C. J. Vandenberg, L. Chen, P. E. Czabotar, S. N. Willis, C. L. Scott, C. L. Day, S. Cory, J. M. Adams, A. W. Roberts and D. C. Huang (2006). "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized." Cancer Cell **10**(5): 389-99.
- Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, S. M. Wayson, A. V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J. N. Dynek, L. O. Elliott, H. J. Wallweber, J. A. Flygare, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, V. M. Dixit and D. Vucic (2007). "IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis." Cell **131**(4): 669-81.
- Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-2.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2005). "IAPs, RINGs and ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 287-97.
- Vaux, D. L. and A. Strasser (1996). "The molecular biology of apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2239-44.
- Veber, D. F., S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward and K. D. Kopple (2002). "Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates." J Med Chem **45**(12): 2615-23.
- Veis, D. J., C. M. Sorenson, J. R. Shutter and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." Cell **75**(2): 229-40.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Villunger, A., E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams and A. Strasser (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." Science **302**(5647): 1036-8.
- Villunger, A., C. Scott, P. Bouillet and A. Strasser (2003). "Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival." Blood **101**(6): 2393-400.

- Vince, J. E., W. W. Wong, N. Khan, R. Feltham, D. Chau, A. U. Ahmed, C. A. Benetatos, S. K. Chunduru, S. M. Condon, M. McKinlay, R. Brink, M. Leverkus, V. Tergaonkar, P. Schneider, B. A. Callus, F. Koentgen, D. L. Vaux and J. Silke (2007). "IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis." Cell **131**(4): 682-93.
- Vogler, M., D. Dinsdale, X. M. Sun, K. W. Young, M. Butterworth, P. Nicotera, M. J. Dyer and G. M. Cohen (2008). "A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells." Cell Death Differ **15**(5): 820-30.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothurn, Schweiz, *Jent und Gassmann*.
- von Thaler, A. K., Y. Kamenisch and M. Berneburg (2010). "The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis." Exp Dermatol **19**(2): 81-8.
- Vucic, D. and W. J. Fairbrother (2007). "The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer." Clin Cancer Res **13**(20): 5995-6000.
- Vucic, D., H. R. Stennicke, M. T. Pisabarro, G. S. Salvesen and V. M. Dixit (2000). "ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas." Curr Biol **10**(21): 1359-66.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel and A. S. Baldwin, Jr. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science **281**(5383): 1680-3.
- Wang, J., M. Kobayashi, M. Han, S. Choi, M. Takano, S. Hashino, J. Tanaka, T. Kondoh, K. Kawamura and M. Hosokawa (2002). "MyD88 is involved in the signalling pathway for Taxol-induced apoptosis and TNF-alpha expression in human myelomonocytic cells." Br J Haematol **118**(2): 638-45.
- Wang, K., X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." Genes Dev **10**(22): 2859-69.
- Wang, L., F. Du and X. Wang (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.
- Wang, Y. F., C. C. Jiang, K. A. Kiejda, S. Gillespie, X. D. Zhang and P. Hersey (2007). "Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1." Clin Cancer Res **13**(16): 4934-42.
- Weber, A., Z. Kirejczyk, R. Besch, S. Potthoff, M. Leverkus and G. Hacker (2009). "Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells." Cell Death Differ.
- Weber, A., Z. Kirejczyk, R. Besch, S. Potthoff, M. Leverkus and G. Hacker (2010). "Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells." Cell Death Differ **17**(6): 942-51.



Weber, A., Z. Kirejczyk, S. Potthoff, C. Ploner and G. Hacker (2009). "Endogenous Noxa Determines the Strong Proapoptotic Synergism of the BH3-Mimetic ABT-737 with Chemotherapeutic Agents in Human Melanoma Cells." Transl Oncol **2**(2): 73-83.

Weber, A., S. A. Paschen, K. Heger, F. Wilfling, T. Frankenberg, H. Bauerschmitt, B. M. Seiffert, S. Kirschnek, H. Wagner and G. Hacker (2007). "BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins." J Cell Biol **177**(4): 625-36.

Weber, C. K., J. R. Slupsky, C. Herrmann, M. Schuler, U. R. Rapp and C. Block (2000). "Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes." Oncogene **19**(2): 169-76.

Wei, M. C., T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." Genes Dev **14**(16): 2060-71.

Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.

Weisberg, E., A. L. Kung, R. D. Wright, D. Moreno, L. Catley, A. Ray, L. Zavel, M. Tran, J. Cools, G. Gilliland, C. Mitsiades, D. W. McMillin, J. Jiang, E. Hall-Meyers and J. D. Griffin (2007). "Potentiation of antileukemic therapies by Smac mimetic, LBW242: effects on mutant FLT3-expressing cells." Mol Cancer Ther **6**(7): 1951-61.

Welcker, M. and B. E. Clurman (2008). "FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation." Nat Rev Cancer **8**(2): 83-93.

Wellbrock, C., M. Karasarides and R. Marais (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 875-85.

Wellbrock, C. and R. Marais (2005). "Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation." J Cell Biol **170**(5): 703-8.

Wertz, I. E., S. Kusam, C. Lam, T. Okamoto, W. Sandoval, D. J. Anderson, E. Helgason, J. A. Ernst, M. Eby, J. Liu, L. D. Belmont, J. S. Kaminker, K. M. O'Rourke, K. Pujara, P. B. Kohli, A. R. Johnson, M. L. Chiu, J. R. Lill, P. K. Jackson, W. J. Fairbrother, S. Seshagiri, M. J. Ludlam, K. G. Leong, E. C. Dueber, H. Maecker, D. C. Huang and V. M. Dixit (2011). "Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7." Nature **471**(7336): 110-4.

Whitfield, J., S. J. Neame, L. Paquet, O. Bernard and J. Ham (2001). "Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release." Neuron **29**(3): 629-43.

Wilhelm, S. M., C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag and P. A. Trail (2004). "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis." Cancer Res **64**(19): 7099-109.

Willis, S. N. and J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-25.

Willis, S. N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams and D. C. Huang (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." Genes Dev **19**(11): 1294-305.

Willis, S. N., J. I. Fletcher, T. Kaufmann, M. F. van Delft, L. Chen, P. E. Czabotar, H. Ierino, E. F. Lee, W. D. Fairlie, P. Bouillet, A. Strasser, R. M. Kluck, J. M. Adams and D. C. Huang (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-9.

Wilson-Annan, J., L. A. O'Reilly, S. A. Crawford, G. Hausmann, J. G. Beaumont, L. P. Parma, L. Chen, M. Lackmann, T. Lithgow, M. G. Hinds, C. L. Day, J. M. Adams and D. C. Huang (2003). "Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity." J Cell Biol **162**(5): 877-87.

Wilson, R., L. Goyal, M. Ditzel, A. Zachariou, D. A. Baker, J. Agapite, H. Steller and P. Meier (2002). "The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis." Nat Cell Biol **4**(6): 445-50.

Wood, S. R., M. Berwick, R. D. Ley, R. B. Walter, R. B. Setlow and G. S. Timmins (2006). "UV causation of melanoma in *Xiphophorus* is dominated by melanin photosensitized oxidant production." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4111-5.

Wu, G., J. Chai, T. L. Suber, J. W. Wu, C. Du, X. Wang and Y. Shi (2000). "Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO." Nature **408**(6815): 1008-12.

Wu, H., J. Tschopp and S. C. Lin (2007). "Smac mimetics and TNFalpha: a dangerous liaison?" Cell **131**(4): 655-8.

Xiang, Z., A. A. Ahmed, C. Moller, K. Nakayama, S. Hatakeyama and G. Nilsson (2001). "Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation." J Exp Med **194**(11): 1561-69.

Xu, Y., X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley and L. Tong (2000). "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains." Nature **408**(6808): 111-5.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda and S. Akira (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-3.

Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.

Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.

Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J. Y. Lang, C. C. Lai, C. J. Chang, W. C. Huang, H. Huang, H. P. Kuo, D. F. Lee, L. Y. Li, H. C. Lien, X. Cheng, K. J.

Chang, C. D. Hsiao, F. J. Tsai, C. H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2008). "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation." Nat Cell Biol **10**(2): 138-48.

Yang, L., Z. Cao, H. Yan and W. C. Wood (2003). "Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy." Cancer Res **63**(20): 6815-24.

Yasumoto, K., K. Yokoyama, K. Shibata, Y. Tomita and S. Shibahara (1994). "Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene." Mol Cell Biol **14**(12): 8058-70.

Yin, C., C. M. Knudson, S. J. Korsmeyer and T. Van Dyke (1997). "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo." Nature **385**(6617): 637-40.

Yin, X. M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth and S. J. Korsmeyer (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." Nature **400**(6747): 886-91.

Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.

Yu, J., L. Zhang, P. M. Hwang, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2001). "PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells." Mol Cell **7**(3): 673-82.

Zall, H., A. Weber, R. Besch, N. Zantl and G. Hacker (2010). "Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1." Mol Cancer **9**: 164.

Zantl, N., G. Weirich, H. Zall, B. M. Seiffert, S. F. Fischer, S. Kirschnek, C. Hartmann, R. M. Fritsch, B. Gillissen, P. T. Daniel and G. Hacker (2007). "Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance." Oncogene **26**(49): 7038-48.

Zarnegar, B. J., Y. Wang, D. J. Mahoney, P. W. Dempsey, H. H. Cheung, J. He, T. Shiba, X. Yang, W. C. Yeh, T. W. Mak, R. G. Korneluk and G. Cheng (2008). "Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK." Nat Immunol **9**(12): 1371-8.

Zha, H., C. Aime-Sempe, T. Sato and J. C. Reed (1996). "Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2." J Biol Chem **271**(13): 7440-4.

Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel and S. J. Korsmeyer (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." Cell **87**(4): 619-28.

Zhang, Y., Y. Xiong and W. G. Yarbrough (1998). "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." Cell **92**(6): 725-34.

Zhong, Q., W. Gao, F. Du and X. Wang (2005). "Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis." Cell **121**(7): 1085-95.

Ziegler, D. S., R. D. Wright, S. Kesari, M. E. Lemieux, M. A. Tran, M. Jain, L. Zawel and A. L. Kung (2008). "Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins." J Clin Invest **118**(9): 3109-22.

Zong, W. X., T. Lindsten, A. J. Ross, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." Genes Dev **15**(12): 1481-6.



## 6 Publikationen

Weber\*, A., **Z. Kirejczyk\***, R. Besch, S. Potthoff, M. Leverkus and G. Hacker (2010). "Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells." Cell Death Differ **17**(6): 942-51. [\* Ko-Erstauterschaft]

Weber, A., **Z. Kirejczyk**, S. Potthoff, C. Ploner and G. Hacker (2009). "Endogenous Noxa Determines the Strong Proapoptotic Synergism of the BH3-Mimetic ABT-737 with Chemotherapeutic Agents in Human Melanoma Cells." Transl Oncol **2**(2): 73-83.



# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Georg Häcker für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu können, für seine stete Unterstützung und seine bereichernden Denkansätze herzlich bedanken.

Prof. Dr. Dieter Langosch darf ich für seine freundliche Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt zu übernehmen, meinen Dank aussprechen.

Ein eigener Dank gilt Dr. Arnim Weber für die vielen angeregten Diskussionen sowie die hervorragende wissenschaftliche Anleitung.

Bei Dr. Robert Besch möchte ich mich für die fruchtbare wissenschaftliche Kooperation bedanken.

Für die Hilfe im Laboralltag sowie für das großartige Arbeitsklima gebührt allen meinen Kolleginnen und Kollegen mein Dank. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Stephanie Potthoff für ihre praktische Unterstützung und Pedro Eitz Ferrer für das Korrekturlesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinem Mann danke ich für seine fortwährende Motivation und seinen Glauben an mich. Moim rodzicom oraz mojej siostrze z rodziną chciałabym z całego serca za ich wsparcie oraz ich ciągłą wiarę we mnie podziękować. Bez nich napisanie tej pracy byłoby niemożliwe. Meinen Schwiegereltern möchte ich für ihre großzügige Hilfe in der Baby-Betreuung während meiner arbeitsintensiven Zeit danken.